



HAL
open science

Caractérisation des communautés et populations bactériennes responsables de la ténacibaculose du platax orbicularis, dans le cadre du développement d'un protocole vaccinal

Joanne Bergues

► **To cite this version:**

Joanne Bergues. Caractérisation des communautés et populations bactériennes responsables de la ténacibaculose du platax orbicularis, dans le cadre du développement d'un protocole vaccinal. Médecine vétérinaire et santé animale. 2021. dumas-04096143

HAL Id: dumas-04096143

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04096143v1>

Submitted on 12 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CARACTERISATION DES COMMUNAUTES ET POPULATIONS BACTERIENNES RESPONSABLES DE LA TENACIBACULOSE DU PLATAX ORBICULARIS, DANS LE CADRE DU DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE VACCINAL

THESE
pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BERGUES Joanne

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités et Praticien hospitalier
Virologie

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Virologie

Pour avoir accepté d'encadrer et de corriger mon travail de thèse, pour ses conseils précieux, sa gentillesse et son engouement scientifique. Sincères remerciements.

A Monsieur Romain VOLMER

Maître de conférence à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Microbiologie – Infectiologie

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Pour l'intérêt porté à la lecture de mon manuscrit et les remarques qui seront apportées. Sincères remerciements.

A Monsieur Denis SAULNIER, Chercheur au centre IFREMER du Pacifique

Pour l'opportunité qu'il m'a offerte de réaliser ce travail de thèse sous son encadrement. Pour ses recommandations, son aide dans mes travaux et pour avoir soutenu et investi dans le projet de mettre au point le protocole vaccinal présenté dans ce document. Sincères remerciements.

A Monsieur Pierre LOPEZ, Doctorant au centre IFREMER du Pacifique

Pour son encadrement et sa pédagogie, pour son aide indispensable dans la planification et la réalisation de ces travaux. Sincères remerciements.

A Monsieur Patrick Vidal, Ancien Directeur du Centre IFREMER du Pacifique

Pour son accueil au sein du centre de recherches et les conditions de travail dont j'ai bénéficié.

A l'ensemble des équipes du centre IFREMER du Pacifique et de la Direction des Ressources Marines de Polynésie Française

Pour leur accueil et leur investissement dans mes travaux. Plus particulièrement à Thomas, Thibaud, Thibault, Maelenne, Caline, Rarahu et Christophe, sans qui ces travaux n'auraient pu être. Sincères remerciements.

Au laboratoire SEPPIC

Pour leur professionnalisme et leur geste commercial nous ayant permis de bénéficier gracieusement d'échantillons des deux adjuvants utilisés dans le cadre de ce travail. Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Table des matières	6
Liste des annexes.....	8
Table des illustrations.....	9
Liste des abreviations	14
Introduction	15
<u>PREMIÈRE PARTIE:</u> Le Contexte Bibliographique	17
I. La filière du <i>Platax orbicularis</i> dans l'aquaculture polynésienne	18
1. Présentation de la Polynésie française.....	18
2. Le développement de la pisciculture locale.....	19
3. La filière du <i>Platax orbicularis</i>	21
II. La ténacibaculose	35
1. Présentation de la maladie	35
2. L'espèce pathogène <i>Tenacibaculum maritimum</i>	39
3. Les méthodes de diagnostic	49
4. Des méthodes de lutte contre la ténacibaculose	62
5. Les connaissances autour de la vaccination des poissons	65
<u>SECONDE PARTIE :</u> Les Travaux Experimentaux.....	73
Cadre de l'étude	74
Objectifs	74
I. Travaux préliminaires : Le suivi zosanitaire des <i>Platax orbicularis</i> issus d'un cycle de production en écloserie et élevés dans deux fermes de grossissement	76
1. La campagne d'échantillonnage	76
2. Les observations répertoriées au cours de ces suivis d'élevage	79
3. Les analyses de laboratoire réalisées au préalable.....	81
II. Étude du microbiote tégumentaire d'un cycle de production de <i>Platax orbicularis</i> soumis à une infection naturelle de ténacibaculose dans deux fermes de grossissements	82
1. Matériel et méthodes	82
2. Résultats.....	90
3. Discussion.....	110
III. Evaluation d'une co-infection par <i>Vibrio harveyi</i> au cours d'un cycle de production de platax infecté par <i>Tenacibaculum maritimum</i>	114
1. Matériel et méthodes	115
2. Résultats.....	118
3. Discussion.....	121

IV. Mise au point d'une méthode de PCR quantitative de sérotypage de l'agent <i>Tenacibaculum maritimum</i> et application à un cycle de production de <i>Platax orbicularis</i> en condition d'infection naturelle au sein de deux fermes d'élevage.	125
Contexte de l'étude.....	125
1. Matériel et méthodes	125
2. Résultats.....	133
3. Discussion.....	150
4. Vers un scénario épidémiologique à partir de prélèvements antérieurs dans différents sites.....	154
V. Infection expérimentale : aspects cliniques et lésionnels d'une infection par les trois sérotypes de <i>T. maritimum</i> et essai vaccinal	157
Considérations éthiques.....	158
1. Matériel et méthodes	159
2. Les résultats de la première infection expérimentale	166
3. Discussion et Perspectives d'études	171
Conclusion.....	175
Bibliographie.....	176
Annexes.....	188

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Alignement de la région V4 des séquences de référence et de souches polynésiennes, dont le génome complet a été séquencé (données non publiées), appartenant au genre <i>Tenacibaculum</i> à partir de la base de données EzBioCloud.	189
ANNEXE 2: Alignement de la région V1-V2 des séquences de référence et de souches polynésiennes, dont le génome complet a été séquencé (données non publiées), appartenant au genre <i>Tenacibaculum</i> à partir de la base de données EzBioCloud.	190
ANNEXE 3 : Présentation des fichiers MultiQc obtenus lors de l'étape de Pré-process avec les outils BBDuk et TrimGalore.	191
ANNEXE 4 : La méthode de PCR quantitative permettant de détecter la présence d'inhibiteur de la réaction, développée par Pierre Lopez (données non publiées)	192
ANNEXE 5 : Quelques informations sur la PCR quantitative	193
ANNEXE 6 : Les courbes de probabilité de survie de Kaplan-Meyer de chaque bac pour le scenario 1, à savoir que les poissons « disparus » sont considérés comme morts.	195
ANNEXE 7 : Présentation des résultats de l'infection expérimentale 1 visant à évaluer la virulence des souches de <i>Tenacibaculum maritimum</i> , 190605A03b (O1), 190115A05h (O2) et TFA4 (O3), et la protection de l'étape de baignade de l'essai vaccinal, selon le scenario 2 considérant les poissons « disparus » comme des retraits.....	196
ANNEXE 8 : Les courbes de probabilité de survie de Kaplan-Meyer de chaque bac pour le scenario 2, à savoir que les poissons « disparus » sont considérés comme des retraits.....	198

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Les Figures

Figure 1 : Carte géographique et zone économique exclusive de la Polynésie française.....	19
Figure 2 : Le <i>Platax orbicularis</i> ou Paraha peu adulte (Direction des Ressources Marines de Polynésie française).....	21
Figure 3 : Le <i>Platax orbicularis</i> juvénile	22
Figure 4 : Courbe de production de la filière piscicole du <i>Platax orbicularis</i> en Polynésie française (Direction Des Ressources Marines 2019).....	25
Figure 5 : Etapes majeures et principales maladies rencontrées au cours du développement de la filière piscicole du <i>Platax orbicularis</i>	26
Figure 6 : Le cycle de production du <i>Platax orbicularis</i>	27
Figure 7 : Séquence alimentaire au cours de la phase larvaire (Gasset, Remoissenet 2012 ©)	29
Figure 8 : Radiographie de platax à l'issue de la phase d'alevinage (Direction des Ressources Marines de Polynésie française).....	30
Figure 9 : Les zones de répartition des espèces pathogènes identifiées lors d'épisodes infectieux de ténacibaculose à travers le monde (adaptée de Pierre LOPEZ).....	37
Figure 10 : Lésions externes de ténacibaculose sur différentes espèces de poisson d'élevage (d'après Pierre LOPEZ).....	38
Figure 11 : Observation des organes internes de la cavité péritonéale de saumons de l'Atlantique au cours d'une étude expérimentale sur les exotoxines de <i>Tenacibaculum maritimum</i> (R. van Gelderen et al. 2009).....	48
Figure 12 : Observation directe, au microscope optique (x1000), de bactéries <i>Tenacibaculum maritimum</i> (souche TFA4) issues d'une culture en milieu liquide (Marine Broth de DIFCO) après une coloration de May Grünwald Giemsa.....	51
Figure 13 : Lésions de la cavité buccale et des branchies (syndrome de la bouche érodée) lors d'une infection par <i>Tenacibaculum maritimum</i> sur des saumons d'Atlantique au Canada (Frisch et al. 2018a).....	52
Figure 14 : Lésions cutanées et aspect des organes internes d'un platax orbicularis atteint de ténacibaculose en condition d'infection expérimentale.	52
Figure 15 : Deux coupes histologique transversales de tégument d'alevins de <i>Platax orbicularis</i> souffrant de ténacibaculose (d'après Lopez et al. 2021)	54
Figure 16 : Coupes histologiques d'organes internes de turbots (<i>Psetta maxima</i>) au cours d'une infection expérimentale par inoculation d'une suspension bactérienne de <i>T. maritimum</i> par injection intrapéritonéale (Faílde et al. 2013).	55
Figure 17 : Aspect morphologique typique de colonies <i>Tenacibaculum maritimum</i> cultivées sur milieu sélectif Marine Agar 2216 (Difco TM).	57

Figure 18 : Présentation synthétique des prélèvements analysés	78
Figure 19 : Présentation de la nomenclature des échantillons à partir d'un exemple.....	79
Figure 20 : Cinétique de mortalité d'alevins <i>Platax orbicularis</i> , observée au cours d'un épisode infectieux de ténacibaculose sur le site de Taha'a (Ferme Maranono). Données non publiées, D. DELNESSE.....	80
Figure 21 : Cinétique de mortalité d'alevins <i>Platax orbicularis</i> , observée au cours d'un épisode infectieux de ténacibaculose sur le site de Toahotu (Ferme Tahiti Fish Aquaculture). Données non publiées, D. DELNESSE.....	80
Figure 22 : Représentation schématique des différentes étapes réalisées pour le traitement des données de métabarcoding.	84
Figure 23 : Présentation des principaux biais techniques et biologiques survenant de l'extraction de l'ADN à l'étape de séquençage (Falentin et al. 2019).....	85
Figure 24 : Représentation schématique de l'obtention d'une chimère au cours du séquençage.....	87
Figure 27 : Distribution du nombre de séquences par échantillon pour la région V4, à l'issue du traitement bio-informatique.....	92
Figure 28 : Distribution du nombre de séquences par échantillon pour la région V1-V2, à l'issue du traitement bio-informatique.....	93
Figure 29 : Présentation de l'abondance des taxons de microorganismes, avec une précision à l'échelle de la famille, selon la nature de l'échantillon dans les différents sites d'élevage.	94
Figure 30 : Présentation de l'abondance des taxons de microorganismes, avec une précision à l'échelle du genre, selon la nature de l'échantillon dans les différents sites d'élevage.	95
Figure 31 : Présentation de l'abondance des principaux taxons identifiés dans les échantillons à partir du séquençage de la région V4 (amorces 515F/806R).....	97
Figure 32 : Les indices d' α -diversité des platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) : Observed (richesse spécifique), indices de Shannon et Simpson.....	101
Figure 33 : La distance de Bray-Curtis des échantillons de platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) des épisodes d'infection naturelle de ténacibaculose.....	102
Figure 34 : Les indices d' α -diversité des platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) des sites de Taha'a et de Toahotu.....	104
Figure 35 : La distance de Bray-Curtis des échantillons de platax asymptomatiques sur les sites de Taha'a et de Toahotu.....	105
Figure 36 : Les indices d' α -diversité des prélèvements de bio-encrassement des structures d'élevage des sites de Taha'a et de Toahotu.....	106
Figure 37 : La distance de Bray-Curtis entre les échantillons de bio-encrassements prélevés sur les structures d'élevage des fermes de Taha'a et de Toahotu.....	107
Figure 38 : Présentation de l'abondance des principaux taxons dans les échantillons séquencés sur les régions V4 et V1-V2 à la précision de la famille et du genre.	109

Figure 39 : Quantification de <i>Vibrio harveyi</i> et <i>Tenacibaculum maritimum</i> des échantillons d'un cycle de platax soumis à une infection naturelle sur les fermes de Taha'a et Toahotu.	119
Figure 40 : Comparaison de la quantification de <i>Tenacibaculum maritimum</i> et <i>Vibrio harveyi</i> par qPCR dans les échantillons des élevages de Taha'a et de Toahotu.....	121
Figure 41 : Comparaison des données de métabarcoding (Abondance des taxons <i>Tenacibaculum</i> et <i>Vibrio</i>) et des résultats de PCR quantitative (<i>T. maritimum</i> et <i>V. harveyi</i> en bactéries/ μ g d'ADN)..	124
Figure 43 : Représentation schématique de deux loci, probablement impliqués dans la synthèse de l'antigène O, sur le génome des souches de <i>Tenacibaculum maritimum</i> et recherche de séquences spécifiques pour chacun des 4 sérotypes connus (O1, O2, O3, O4).....	128
Figure 44 : Représentation schématique de la méthode soustractive utilisée pour la quantification du sérotype O2 à partir du signal des sérotypes O2 et O3 associés (O2_O3) et du signal O3 seul.	129
Figure 45 : Scenarii théoriques indiquant la possibilité de détecter et de quantifier l'ADN du sérotype de <i>Tenacibaculum maritimum</i> ciblé (symbole vert) ou non (croix rouge) pour les cinq méthodes de PCR quantitative développées (O1, O3, O4, O1_O2 et O2_O3) en fonction de la composition de l'échantillon.....	144
Figure 46 : Représentation graphique de la corrélation entre les deux méthodes soustractives visant à quantifier le sérotype O2.	146
Figure 47 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons de l'élevage larvaire et de la ferme de Taha'a (en bactéries/ μ d'ADN).	147
Figure 48 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons des platax sur le site de l'écloserie (en conditions non biosécurisées) entre 1g et 9g et dans la ferme de Toahotu (en bactéries/ μ d'ADN).....	148
Figure 49 : Comparaison des méthodes de PCR quantitatives ciblant l'ensemble des bactéries <i>T. maritimum</i> ou la somme des sérotypes connus quantifiés, à partir de 120 échantillons de la campagne.	153
Figure 50 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons des platax sur le site de l'écloserie (en conditions non biosécurisées) entre 1g et 9g et dans la ferme de Toahotu (en bactéries/ μ d'ADN).....	155
Figure 51 : Le protocole vaccinal et les infections expérimentales puis naturelles associées.....	163
Figure 52 : Position du point d'injection de la solution vaccinale dans la cavité péritonéale d'un platax de 47 jours d'âge.	164
Figure 53 : Plan de la salle expérimentale et répartition des conditions d'infection.....	165
Figure 54 : Bilan des survies, mortalités, retraits et disparus de l'infection expérimentale n°1.	167
Figure 55 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des platax des conditions de l'infection expérimentale 1: Souche O1, O2, O3, mélange 3 souches et témoins non infectés (scenario 1).....	169
Figure 56 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des platax des conditions de l'infection expérimentale 1: témoins non infectés, infectés 3 souches et vaccinés et infectés 3 souches (scenario 1).	170

Les Tableaux

Tableau 1 : Les symboles des nucléotides.....	14
Tableau 2 : Les stades de développement larvaire et post-larvaire (Gasset, Remoissenet 2012 ©).....	28
Tableau 3 : Exemples d'espèces de <i>Tenacibaculum maritimum</i> et leur origine géographique. (Adapté de Wade, Joy 2020).....	41
Tableau 4 : Diagnostic différentiel des maladies ulcératives des poissons d'eau de mer et incidence des pathogènes impliqués en Polynésie française (Noga 2000 ; Van Cam 2009).....	50
Tableau 5 : Synthèse des observations rapportées au cours des épisode symptomatiques de ténacibaculose dans les fermes aquacoles de Maranono (Taha'a) et TFA (Toahotu). Données non publiées issues du stage de D. Delnesse.....	79
Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour le séquençage des régions V4 et V1-V2 de l'ARNr 16s par l'entreprise Genome Quebec avec la technologie Illumina MiSeq PE250.....	82
Tableau 7 : Présentation du nombre de séquences conservées à l'issue des étapes de traitement bio-informatique réalisé avec les outils TrimGalore et dada2.....	91
Tableau 8 : Les amorces sens, anti-sens et la sonde de la réaction de PCR permettant de quantifier l'agent <i>Vibrio harveyi</i> à partir du gène ToxR.....	116
Tableau 9 : Les paramètres obtenus lors de la mesure de l'efficacité de la réaction de qPCR ciblant <i>Vibrio harveyi</i> avec la souche LMG 4044.....	116
Tableau 10 : Les amorces sens, anti-sens et la sonde de la réaction de PCR permettant de quantifier l'agent <i>Tenacibaculum maritimum</i> à partir du gène MARIT_1720.....	117
Tableau 11 : Les réactifs de la réaction de PCR quantitative ciblant <i>Tenacibaculum maritimum</i> sur le gène MARIT_1720 et développée par Pierre LOPEZ	117
Tableau 12 : Les paramètres obtenus lors de la mesure de l'efficacité de la réaction de qPCR ciblant <i>T. maritimum</i> avec la souche NCIMB2154 ^T	118
Tableau 13 : Séquences nucléotidiques des amorces dessinées pour les réactions qPCR des sérotypes de <i>T. maritimum</i> sur les gènes codant pour l'antigène O.....	130
Tableau 14 : Les souches de référence de <i>T. maritimum</i> utilisées dans cette étude et leur origine.....	132
Tableau 15 : Paramètres déterminant la mesure de l'efficacité de la réaction pour le couple d'amorces sélectionné pour chacun des sérotypes ciblés (O1, O2, O2_O3, O4).....	136
Tableau 16 : Résultats théoriques et obtenus (2 répliquats techniques) en qPCR de sérotypage pour les mélanges de sérotypes de quantité connue.....	138
Tableau 17 : Séquences nucléotidiques des amorces dessinées pour les réactions qPCR ciblant les sérotypes O1 et O2 de <i>T. maritimum</i> sur les gènes codant pour l'antigène O.....	140
Tableau 18 : Données relatives à la mesure de l'efficacité de la réaction pour les trois couples d'amorces évalués ciblant les sérotypes O1 et O2 conjointement (sérotipe O1_O2).....	141
Tableau 19 : Résultats théoriques et obtenus en qPCR de sérotypage pour les mélanges de sérotypes de quantité connue.....	142

Tableau 20 : Evaluation de l'homogénéité des résultats obtenus pour les trois bacs d'une même condition.....	168
Tableau 21 : Test du log-rank indiquant les différences significatives ou non entre les courbes de survie de Kapla-Meyer des 6 conditions évaluées (souche O1, O2, O3, mélange 3 souches, vaccinés et infectés 3 souches et non infectés) dans le cadre du scenario 1.	170

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNe : ADN environnemental

ARN : Acide Ribonucléique

ASV : *Amplicon Sequence Variant*

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*

Nbr bct : Nombre de bactéries

NMDS : *Non-Metric multiDimensional Scaling*

NTC : *No Template Control* (témoin négatif, sans matrice en qPCR)

Pb : Paires de bases

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RAPD : *Random amplified polymorphic DNA*

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultraviolet

Tableau 1 : Les symboles des nucléotides

Symbole	Nucléotide
A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine (équivalent à l'uracile U de l'ARN)
M	A ou C
R	A ou G
W	A ou T/U
S	C ou G
Y	C ou T/U
K	G ou T/U
V	A ou C ou G
H	A ou C ou T/U
D	A ou G ou T/U
B	C ou G ou T/U
N	A ou C ou G ou T/U, « unknown » ou « other »

INTRODUCTION

En Polynésie française, la principale source de protéine de l'alimentation des habitants insulaires est la chair de poisson. Or, les ressources lagunaires se raréfient, notamment dans les îles les plus peuplées comme Tahiti et Moorea qui importent régulièrement des denrées issues de la pêche, provenant des îles environnantes. Pour répondre à cette demande, une filière piscicole a été mise en place progressivement dans les années 2000. Elle est aujourd'hui entièrement consacrée à l'élevage du *Platax orbicularis*, également appelé « Paraha peu » par la communauté polynésienne.

Le cycle de production du *Platax orbicularis* est à ce jour maîtrisé. Les premières étapes du cycle de production (élevage larvaire et alevinage) se déroulent en conditions bio-sécurisées, c'est à dire avec une eau de mer filtrée et traitée aux rayonnements ultra-violets. Les dernières étapes du cycle (pré-grossissement et grossissement) sont effectuées en cages lagunaires dans des fermes aquacoles privées. Néanmoins, depuis 2009 une maladie, tout d'abord qualifiée de « maladie des tâches blanches », survient fréquemment à la mise en cages lagunaires des animaux et induit des mortalités conséquentes touchant 20 à 90% des lots de poissons. La communauté scientifique locale a identifié *Tenacibaculum maritimum* comme le principal agent étiologique responsable des symptômes observés.

La ténacibaculose est une maladie qui affecte de nombreuses espèces de poissons marins et que l'on retrouve dans les élevages piscicoles du monde entier. Les avancées scientifiques sur la maladie et le développement de méthodes de diagnostic sont relativement récentes et de nombreuses connaissances manquent encore pour comprendre les modalités d'infection. Depuis quelques années un vaccin inactivé est commercialisé en Espagne, mais son efficacité peut être sujette à controverses. A ce jour, l'antibiothérapie est un des seuls traitements efficaces contre les agents infectieux de la ténacibaculose.

Toutefois, la ténacibaculose chez le *Platax orbicularis* est une maladie touchant les poissons juvéniles dans les cages lagunaires, au stade de pré-grossissement. Procéder à une antibiothérapie massive des lots de poissons dans un milieu ouvert pourrait avoir des conséquences dramatiques pour l'environnement local.

Ainsi, ce travail s'inscrit dans la volonté d'acquérir des connaissances approfondies sur la maladie et de mettre au point une solution éco-responsable durable contre la ténacibaculose. Pour cela, des méthodes validées par la communauté scientifique ont été utilisées et de nouvelles techniques ont été développées.

Dans un premier temps, ce travail présente la filière piscicole du *Platax orbicularis* en Polynésie française, puis les connaissances acquises par la communauté scientifique sur la ténacibaculose. La mise en place de la filière piscicole ainsi que les modalités du cycle de production sont exposées. Puis, la maladie est présentée, ainsi que la démarche et les outils diagnostiques disponibles. Afin d'exposer les connaissances nécessaires au développement d'un protocole vaccinal, les traitements curatifs et prophylactiques existant ainsi que des explications sur le système immunitaire du poisson sont développés.

Dans un second temps, les travaux expérimentaux conduits à partir des échantillons d'un lot de platax en conditions d'infection naturelle au sein de deux fermes d'élevage sont présentés. Ils ont été opérés dans le but d'acquérir des connaissances sur les communautés bactériennes présentes au cours de l'infection. Puis le développement d'un outil de typage bactérien de l'agent étiologique *Tenacibaculum maritimum*, fondé sur l'identification et la quantification des sérotypes de la bactérie est décrit. Enfin l'expérimentation d'un protocole vaccinal visant à induire une protection immunitaire à partir de trois souches locales inactivées est exposée.

PREMIÈRE PARTIE:

LE CONTEXTE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. La filière du *Platax orbicularis* dans l'aquaculture polynésienne

1. Présentation de la Polynésie française

La Polynésie française est constituée de 118 îles dont Tahiti, l'île principale, rassemble plus de 70% de la population polynésienne qui compte 276 000 habitants (recensement 2017, Institut de la statistique de la Polynésie française). Papeete, la capitale localisée sur l'île de Tahiti, se situe à 15 700 km du territoire métropolitain. Les îles de Polynésie sont réparties en cinq archipels soit l'archipel de la Société, l'archipel des Marquises, l'archipel des Australes, l'archipel des Tuamotu et l'archipel des Gambiers (Figure 1). L'archipel des Tuamotu rassemble 78 îles basses, ou atolls, constituées uniquement de récifs coralliens entourant un lagon.

Le climat polynésien est tropical, océanique, chaud et humide. Il se compose d'une saison « chaude », de décembre à avril, pendant laquelle la température varie entre 27°C et 35°C et d'une saison « fraîche », de mai à novembre, avec une température comprise entre 21°C et 27°C. La température des lagons se situe entre 23°C et 29°C.

La zone économique exclusive (ZEE) de ce territoire d'outre-mer s'étend sur environ 5 500 000km² ce qui représente 40% de la ZEE française (Direction Polynésienne des Affaires Maritimes). Les terres émergées ne représentent qu'une très faible surface d'environ 4 000km², ce qui correspond à la moitié de la superficie de la Corse.

Le développement de filières aquacoles (crevetticoles et piscicoles) en zone lagunaire constitue donc un enjeu pour la Polynésie française et s'inscrit dans une volonté de développement économique et d'atteinte d'une autosuffisance alimentaire.

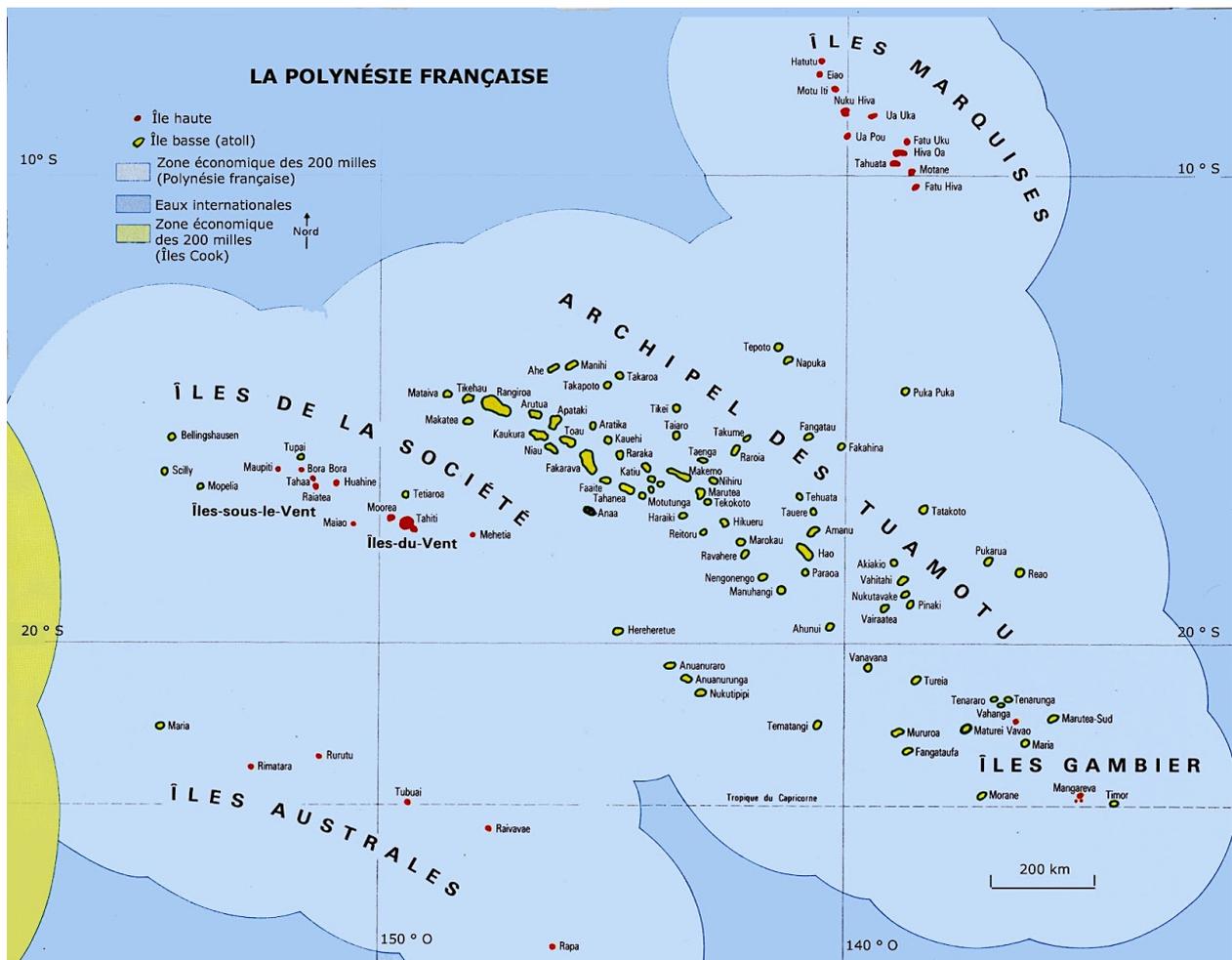


Figure 1 : Carte géographique et zone économique exclusive de la Polynésie française

2. Le développement de la pisciculture locale

a) Les enjeux du développement d'une filière piscicole

La consommation de poisson constitue le principal apport de protéines animales pour les populations insulaires.

Cependant, la zone de pêche de Tahiti ne lui permet plus de s'autosuffire suite à l'épuisement des ressources et à la croissance démographique de l'île. Ainsi, l'île est contrainte de s'approvisionner auprès des pêcheurs des îles voisines dont les réserves de poissons pourraient ainsi se trouver menacées à leur tour d'épuisement.

Par ailleurs, la consommation de plusieurs espèces de poissons lagunaires peut induire une intoxication alimentaire, la ciguatera, connue également sous le nom de « gratte ». Cette maladie alimentaire est induite par l'ingestion de chairs de poissons contaminées par la ciguatoxine produite par la microalgue *Gambierdiscus toxicus* présente dans les récifs

coraliens. La toxine est concentrée dans les plus gros poissons, principalement carnassiers, par accumulation au cours de la chaîne alimentaire.

Face à ces enjeux sanitaires et de gestion des ressources marines, le développement de la pisciculture constitue un espoir prometteur. Pour ces raisons, le pays de la Polynésie française par le biais de la Direction des ressources marines et en partenariat avec le centre IFREMER du Pacifique mène depuis plus de vingt ans des recherches afin de développer une filière piscicole.

A ce jour, l'aquaculture polynésienne rassemble trois filières de production : l'élevage de crevettes (*Litopenaeus stylirostris*), l'élevage du poisson Paraha peue (*Platax orbicularis*), l'élevage de bénitiers (*Tridacna maxima*) pour le repeuplement et l'aquariophilie (source : Direction des Ressources Marines de Polynésie française). Seule la filière piscicole du *Platax orbicularis* est présentée dans cette étude.

b) Les débuts de la pisciculture en Polynésie française

L'origine de la pisciculture polynésienne remonte au début des années 80 avec l'élevage d'espèces introduites : le loup tropical (*Lates calcarifer*) ou barramundi puis une espèce de Tilapia (*Oreochromis sp.*). Une écloserie est construite sur la commune de Taravao (presqu'île de Tahiti), en 1992, permettant la fourniture d'alevins de barramundi.

Les difficultés économiques liées à ces filières (maladie virale en écloserie et commercialisation non maîtrisée) ont orienté la pisciculture vers la production d'espèces lagunaires locales dans les années 2000, dans un premier temps à partir de captures de juvéniles sauvages.

En parallèle, une sélection d'espèces locales présentant un potentiel pour de l'écloserie conventionnelle a été réalisée. Trois espèces locales, le tarpon des sables (*Polydactylus sexfilis*) connu en Polynésie sous le nom de « moi », le platax (*Platax orbicularis*) appelé localement « Paraha peue » et la carangue dorée (*Gnathanodon speciosus*) nommée « Paaihere manini » localement, ont été choisies pour des raisons économiques, biologiques et zootechniques (Le Maréchal, Remoissenet 2001). Des programmes de recherche sont alors menés dans l'objectif de maîtriser les cycles de reproduction de ces espèces pour une production en écloserie. En 2006, le *Platax orbicularis* est rapidement sélectionné pour le développement de la filière (Remoissenet et al. 2006).

3. La filière du *Platax orbicularis*

a) Les caractéristiques du *Platax orbicularis*

Le *Platax orbicularis*, connu sous le nom de « paraha peu » en Polynésie française, est un poisson lagonaire autochtone, dont la chair est très prisée notamment par la communauté asiatique locale (Figure 2). Il a été sélectionné dans le cadre du développement de cette filière aquacole en 2003, car il présente un fort potentiel économique avec une production pour le marché polynésien (Maamaatuaiahutapu et al. 2008).



Figure 2 : Le *Platax orbicularis* ou Paraha peu adulte (Direction des Ressources Marines de Polynésie française)

▪ Classification

Ce poisson appartient à l'embranchement des vertébrés, la classe des Ostéichthyens, l'ordre des Perciformes, la famille des Ehippidae et le genre des *Platax*, son espèce étant connue sous le nom de *Platax orbicularis*. Les noms de « poule d'eau », « poisson chauve-souris », « poisson lune », « poisson papillon » et, en Polynésie, de « paraha peu » sont également utilisés pour le désigner.

▪ Description

Le *Platax orbicularis* a une forme ovale très aplatie latéralement. Les adultes peuvent mesurer jusqu'à 50 cm de diamètre et ils sont de couleur argentée avec des nageoires dorsales, anales et caudales de couleur jaune bordée de noir. Les nageoires pelviennes sont noires avec une coloration jaune à leur base. Ce poisson présente deux bandes noires verticales caractéristiques au niveau de l'œil et de la nageoire pectorale. Il n'y a pas de dimorphisme

sexuel chez cette espèce. Les juvéniles ont une teinte marron-orangée et leur corps est très allongé par des nageoires dorsale et anale très développées (Figure 3). Leur apparence ressemble à celle d'une feuille morte, d'autant plus qu'ils présentent un comportement mimétique de nage horizontale à la surface de l'eau.



Figure 3 : Le *Platax orbicularis* juvénile (Direction des Ressources Marines de Polynésie française)

- Distribution géographique

Le *Platax orbicularis* est retrouvé dans la région Indopacifique ainsi que dans la mer Rouge. Les limites de sa distribution géographique selon l'axe nord-sud sont positionnées au niveau du Japon méridional au nord et par la zone rassemblant l'Australie et la Nouvelle-Calédonie au sud. Sa zone de répartition s'étend vers l'est jusqu'à atteindre le continent Africain.

- Ecologie

L'habitat du *Platax orbicularis* est localisé au niveau des récifs coraliens à une profondeur variable de 30 mètres en moyenne. Les adultes sont très peu observés en bancs de nombreux individus et se situent souvent en pleine eau, sur les pentes externes des récifs. Les juvéniles sont retrouvés en zone lagunaire, régulièrement à proximité des rivages calmes. Ils sont souvent aperçus nageant à proximité d'objets flottants (Gasset, Remoissenet 2012). Le platax est un poisson omnivore dont l'alimentation est composée d'algues, d'invertébrés et de petits poissons. Les jeunes animaux semblent adopter deux comportements alimentaires : une chasse active de zooplancton (Barros et al. 2008), plutôt la nuit, et un broutage algal le jour.

- Reproduction

La maturité sexuelle est atteinte à un poids de 900 g pour les mâles et de 1,6 kg pour les femelles. Le sexe est différencié lors de la puberté mais des inversions sexuelles sont possibles bien que non connues à ce jour en Polynésie (Gasset et al. 2009). Le platax est un poisson ovipare, les femelles pouvant pondre jusqu'à 100 000 œufs de 1,3 mm de diamètre par kilogramme de chair. La fécondation des œufs est externe, elle a lieu après le dépôt des œufs par la femelle dans le milieu.

b) Petit historique de la filière du *Platax orbicularis*

En 2002, la domestication de l'espèce du *Platax orbicularis* a débuté avec la formation de plusieurs lots de reproducteurs, capturés dans leur milieu naturel, afin d'approvisionner les élevages de la filière en jeunes individus. En 2003, des agents infectieux sont détectés pour la première fois sur les individus domestiqués, il s'agit d'infestations par des ectoparasites (*Neobenedenia sp.* et *Cryptocaryon sp.*).

En 2004, des animaux de la première génération (F1) ont été obtenus, par fécondation artificielle puis naturelle (Boichard 2008). L'élevage larvaire et le grossissement en cage sont réalisés cette même année. En 2005, une infection par le nodavirus, agent de l'encéphalopathie et la rétinopathie virale, est diagnostiquée sur deux lots présentant des symptômes nerveux (nage désorientée, en spirale) et une forte mortalité au stade larvaire. Ces individus sont également porteurs d'une bactérie de type rickettsia-like non identifiée. Des cas de lymphocystose causés par un iridovirus sont identifiés (Van Cam 2009).

En 2007, les premiers individus de deuxième génération (F2), issus du lot de reproducteurs de la génération F1 sont obtenus. Le cycle complet de l'élevage est mené à terme. En outre, un lot est sujet à une colonisation importante par une bactérie Chlamydia-like responsable d'épithéliocystis. Des infestations importantes par les ectoparasites *Neobenedenia sp.*, *Benedenia seriolae* et *Trichodina sp.* des platax en cage de grossissement sont également observées, sans provoquer de mortalité importante.

En 2008, un protozoaire cilié appartenant au genre *Caligus* est détecté pour la première fois sur des platax sauvages et un lot d'animaux d'élevage est infesté par *Cryptocaryon irritans*.

Le protocole d'abattage et de conditionnement des platax est mis au point en 2009. Cette même année la première ferme privée, assurant la fin du cycle de production à partir de l'étape de pré-grossissement en cages lagunaires, débute son activité. Des épisodes symptomatiques causant de fortes mortalités, quelques semaines après le transfert en cages lagunaires, sont alors décrits pour la première fois comme la « maladie des taches blanches » mais l'agent étiologique n'est pas identifié.

Les connaissances des étapes de production larvaire et d'alevinage, alors maîtrisées en écloserie expérimentale, sont ensuite transférées vers le secteur privé avec l'ouverture de l'écloserie territoriale VAIA en 2011. Environ 20 000 alevins sont produits par cycle, quatre fois par an. Au niveau des lieux d'élevage, les agents infectieux *Tenacibaculum maritimum* et *Vibrio harveyi* sont retrouvés en co-infection sur des lots de poissons subissant de fortes mortalités et porteurs des lésions de la « maladie des taches blanches » (Swarup-Gaucher 2011).

Une nouvelle ferme privée est ouverte sur l'île de Taha'a en 2013. Deux fermes privées intensives et une ferme extensive sont alors en activité. Cette même année, l'infection expérimentale de lots de platax par *Tenacibaculum maritimum* est maîtrisée (Saulnier et al. 2013 ; 2016). La symptomatologie observée est identique à la « maladie des tâches blanches ». *Vibrio harveyi* est régulièrement retrouvé sur des Platax sans provoquer de symptômes.

En 2019, seule une ferme intensive privée conserve son activité piscicole. L'infection systématique des jeunes poissons par la ténacibaculose lors du transfert en cage lagunaire et les fortes pertes associées incitent les éleveurs à abandonner la filière piscicole du *Platax orbicularis*.

A ce jour, seule une ferme aquacole, Tahiti Fish Aquaculture, poursuit l'élevage des platax. La production locale a chuté de 22 tonnes produites annuellement, en moyenne, de 2015 à 2018 (Figure 4) à 13 tonnes produites en 2019 (Direction des ressources marines de Polynésie française). Cette faible productivité de la filière est principalement due aux épisodes quasi-systématiques de ténacibaculose qui touchent les alevins dans le mois qui suit leur transfert en cage de grossissement. La mortalité atteint 20 à 90% des lots. Les études scientifiques menées localement n'ont pour l'instant pas réussi à trouver de solution durable, prophylactique ou curative, pour diminuer significativement les conséquences de la maladie. Seule la production d'animaux de plus grosse taille (60g au lieu de 10g), avant leur transfert en cages lagunaires, semble réduire les mortalités dues à la ténacibaculose.

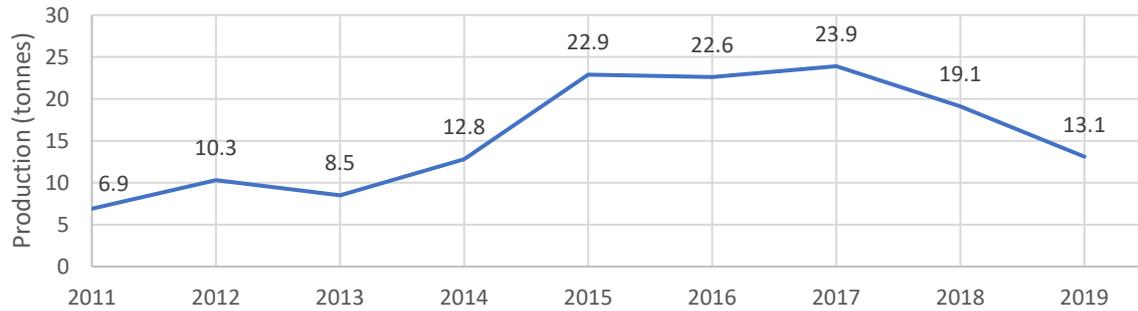


Figure 4 : Courbe de production de la filière piscicole du *Platax orbicularis* en Polynésie française (Direction Des Ressources Marines 2019)

Les enjeux de la filière à ce jour sont :

- la maîtrise de la biosécurité en éclosion (Figure 5). Plusieurs lots d'élevage larvaire ont été successivement éliminés au début de l'année 2021 suite à une infection à nodavirus. La maladie était jusqu'alors maîtrisée depuis l'assainissement des lots de géniteurs en 2004.
- l'infestation des individus en cage de grossissement par des ectoparasites (*Neobenedenia sp*, *Cryptocaryons sp*, *Caligus sp*.) reste également une problématique compte tenue de la difficulté à traiter les individus en zone lagunaire.
- la recherche de solutions durables contre la ténacibaculose, considérée comme le frein majeur au développement de la filière, est encore aujourd'hui l'un des thèmes majeurs de la recherche aquacole menée en Polynésie française.

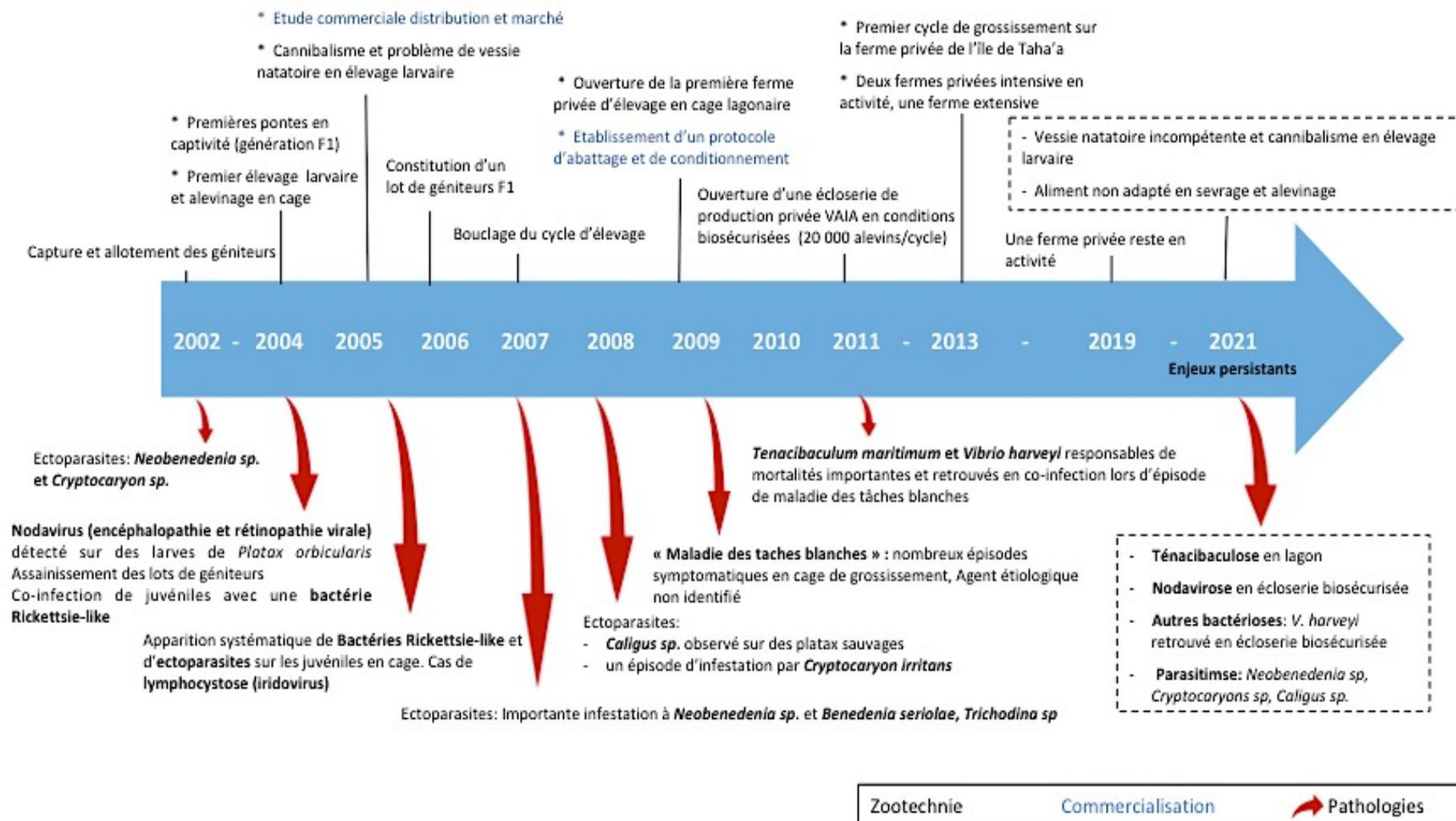


Figure 5 : Etapes majeures et principales maladies rencontrées au cours du développement de la filière piscicole du *Platax orbicularis*

c) Le cycle de production et les techniques d'élevage

Les premières étapes du cycle de développement (incubation des œufs, phase larvaire, sevrage, alevinage) sont assurées par l'écloserie VAIA et des alevins de 10 à 60 grammes sont vendus aux fermiers qui assurent le grossissement des platax, en cage lagonaire, jusqu'au poids de vente de 1kg (Figure 6). L'écloserie assure quatre cycles de production par an.

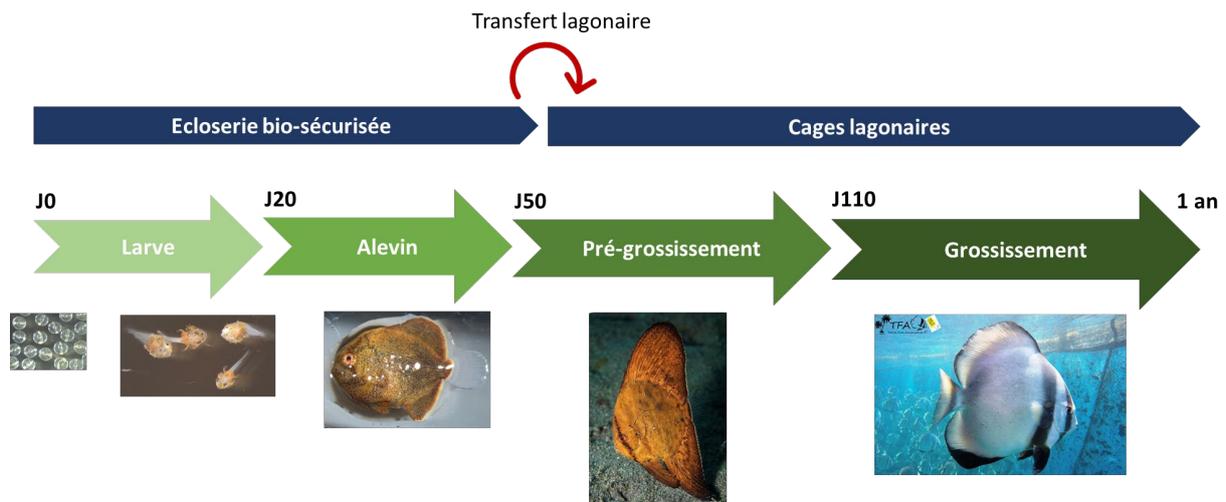


Figure 6 : Le cycle de production du *Platax orbicularis*

▪ Les lots de reproducteurs

Les géniteurs sont élevés en conditions biosécurisées c'est-à-dire dans une eau de mer filtrée (filtre à sable puis à poche jusqu'à 10 μ m), dégazée et désinfectée aux rayons ultraviolets (lampe UV de 200mJ/cm²). La photopériode est de 11h à 13h par jour et la température de l'eau varie entre 25 et 30°C. La densité de population est de 2kg.m³. Des traitements préventifs par dessalure de l'eau à 15‰ pendant 5 jours sont réalisés avant un transfert. Ils permettent d'éliminer les ectoparasites et certaines bactéries marines présents sur les poissons. Des dessalures de l'eau étaient effectuées régulièrement afin de synchroniser et d'induire les pontes nécessaires au démarrage des cycles de l'écloserie. Ce procédé a été arrêté en saison chaude car les taux de fécondation obtenus étaient régulièrement inférieurs aux critères de référence mis en place depuis 2011. Après des années d'acclimatation des géniteurs, les pontes en captivité ont lieu toute l'année et produisent en moyenne 143 000, \pm 38 000 œufs par mois et par kg de femelle (Gasset, Remoissenet 2012).

- L'élevage larvaire et l'alevinage

Les œufs sont déposés en bassin d'élevage à une densité de référence de 30 œufs/L, sous des conditions biosécurisées (eau de mer filtrée à 10µm et désinfectée grâce à une lampe à rayonnements ultraviolets de 200mJ/cm²). L'éclosion se produit après 24h d'incubation à 28°C à un taux d'environ 80%. D'un œuf mesurant en moyenne 1.3mm de diamètre sort une larve de 3.7mm en longueur.

Au début de l'élevage larvaire, l'obscurité est maintenue jusqu'à la première distribution d'aliment à l'ouverture de la bouche des larves de platax. La photopériode est alors de 12h par jour. Le développement des larves est rapide chez cette espèce puisque l'ouverture de la bouche et l'apparition des yeux a lieu dans les 48h suivant l'éclosion (Tableau 2). La cinétique de développement lors des premiers stades de vie est cependant très dépendante de la température de l'eau. L'écart de croissance pouvant être obtenus après 18 jours d'élevage larvaire à une température de 26°C et de 29°C, est d'environ 30% pour la croissance en longueur (Gasset, Remoissenet 2012).

Tableau 2 : Les stades de développement larvaire et post-larvaire (Gasset, Remoissenet 2012 ©)

Jours	Stades
1-2	Résorption de la vésicule (pro-larve et larve)
3-4	Stade post-larvaire 1
7-16	Stade post-larvaire 2
17-20	Pré-métamorphose (bande noire céphalique dorsale)
21-22	Métamorphose
23-28	Métamorphose terminale (fin de période larvaire)
30-60	Croissance allométrique des nageoires dorsale et anale

Les larves de platax épuisent leurs réserves vitellines au 6^{ème} jour post-éclosion à 26°C. L'alimentation apportée est zooplanctonique (rotifères, nauplies d'artémies puis artémies pré-grossies) et doit être adaptée à la petite taille de la bouche des individus au cours des différents stades (Waqalevu et al. 2020). Le sevrage des individus depuis les proies vivantes vers un aliment sec inerte est l'étape la plus délicate lors de l'alevinage des poissons en écloserie. Il commence au 16^{ème} jour après l'éclosion et la transition alimentaire se poursuit pendant environ 10 jours (Figure 7). Les larves sont alors élevées avec une densité de 3 à 4 larves par litre.

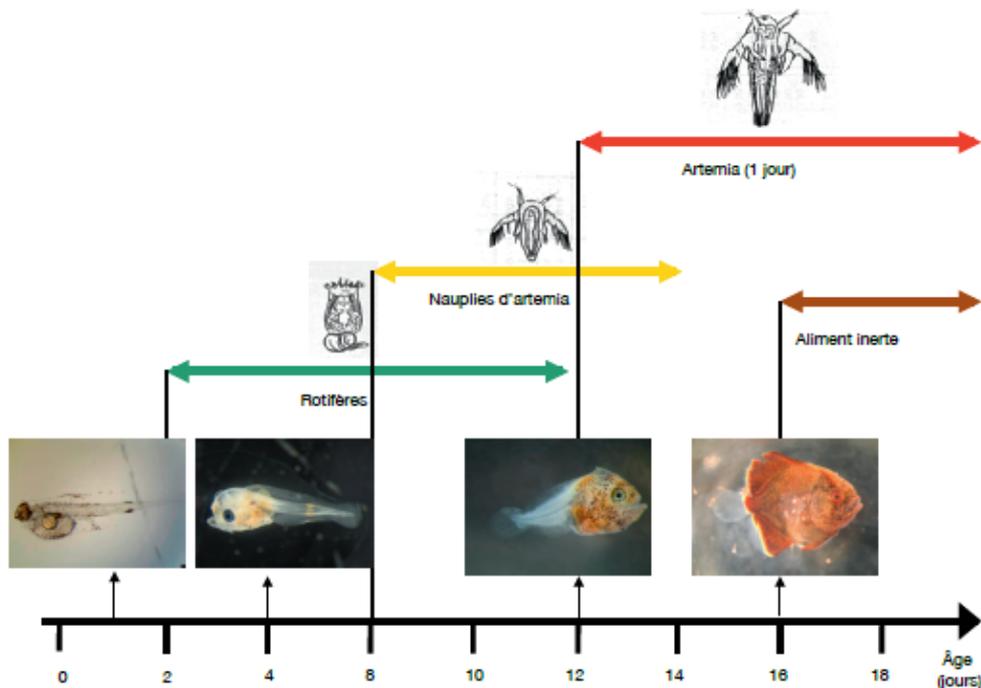


Figure 7 : Séquence alimentaire au cours de la phase larvaire (Gasset, Remoissenet 2012 ©)

La formation de la vessie natatoire du platax a lieu 39h à 72h après l'éclosion. L'inflation de cet organe a lieu entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour de vie à une température comprise entre 26°C et 28°C. Cet organe est un diverticule du tube digestif rempli de gaz qui permet au poisson de faciliter son maintien dans la colonne d'eau. L'intégrité de la vessie natatoire est contrôlée au 8^{ème} jour post-éclosion, le taux de vessies natatoires fonctionnelles devant être supérieur à 90%. Un tri des alevins est effectué à l'issue de la phase larvaire dans l'objectif d'homogénéiser le poids des animaux avant la phase d'alevinage. Pour le poids moyen des jeunes platax, le niveau d'homogénéité des lots est correct s'il est inférieur à 20%. Les jeunes platax pèsent en moyenne 1g à ce stade et ils sont élevés à une densité d'une larve par litre à l'issue du tri.

La métamorphose, qui correspond au passage de la larve au juvénile, est marquée par la courbure de la colonne vertébrale, une forte croissance des nageoires et une modification de la couleur orangée des jeunes platax vers le brun. L'alevinage se poursuit en conditions biosécurisées jusqu'au poids de 10g. Les alevins sont alors nourris uniquement avec un aliment industriel inerte. Le taux de survie final des alevins ainsi que le taux de malformation du lot est vérifié par radiographie sur un minimum de 50 alevins lors de la semaine qui précède la sortie d'écloserie (Figure 8).



Figure 8 : Radiographie de platax à l'issue de la phase d'alevinage (Direction des Ressources Marines de Polynésie française)

Les jeunes platax sont ensuite fréquemment transférés dans des bassins extérieurs en conditions non bio-sécurisées à l'issue de la phase d'alevinage et avant leur transfert dans les fermes privées où se déroule la suite du cycle de production. Des essais expérimentaux ont suggéré que cette étape intermédiaire conférerait une résistance accrue aux juvéniles contre les pathogènes responsables de fortes mortalités à la mise en cage, dont *Tenacibaculum maritimum* plus particulièrement. Un projet, mené par le centre IFREMER du Pacifique et ses partenaires, est actuellement en cours pour étudier ce phénomène. L'objectif est d'observer si une phase de développement en milieu ouvert, dans les jeunes stades de vie des poissons, permet de stimuler une immunité par un premier contact avec des agents pathogènes. L'intérêt serait d'acquérir une immunité protectrice permettant de diminuer les mortalités de façon significative lors de la mise en cages lagunaires. L'étude de ce premier contact avec des agents pathogènes à différents stades de vie (1g et 10g) avant la mise en cage, peut permettre d'identifier plus précisément un stade de développement d'intérêt pour stimuler une immunité protectrice. Cette information pourrait s'avérer utile dans la recherche d'un protocole vaccinal pour le *Platax orbicularis*.

- L'étape de grossissement et la fin du cycle de production

Le transfert des alevins vers les fermes de grossissement nécessite d'apporter un soin particulier lors des manipulations zootechniques. Des normes de transport et de mise en élevage des animaux ont été mises au point pour les acteurs de la filière. Il est important de limiter le stress et l'induction de lésions lors des manipulations, afin de faciliter l'adaptation des poissons au nouveau milieu et limiter l'apparition de maladies. Au sein des élevages

piscicoles, les poissons sont réunis dans des cages situées dans le lagon. Il s'agit de structures flottantes de formes et volumes divers. Les platax sont ensuite abattus et conditionnés par les éleveurs. La vente des animaux au poids de 900g est estimée comme la meilleure mise en valeur du produit par les études technico-commerciales menées sur cette espèce (Gasset, Remoissenet 2012).

d) Suivi sanitaire et prophylaxie

De par son isolement géographique et d'échanges internationaux limités et contrôlés, la Polynésie française est indemne de la plupart des maladies majeures qui sont rencontrées en pisciculture. Le maintien de ce statut sanitaire nécessite des mesures de prophylaxie rigoureuses ainsi qu'une surveillance régulière pour tous les niveaux de la filière. Les éleveurs sont tenus de respecter les bonnes pratiques d'élevage (densité de population, surveillance des maladies, etc.). Pour les aider dans leur mission, ils bénéficient d'une assistance zootechnique et zoosanitaire dispensée par des organismes privés (Cliniques vétérinaires privées) ou publics (Direction des ressources marines de Polynésie française, Coopérative des aquaculteurs de Polynésie française). Les autorités sanitaires locales (Direction de la biosécurité de Polynésie française) sont tenues d'assurer le suivi et la protection des cheptels et des frontières.

▪ La prophylaxie au sein de l'écloserie VAIA

Les mesures prophylactiques visent à éviter l'entrée de pathogènes et le développement de maladies au sein des élevages. Elles doivent prendre en compte tous les vecteurs de contamination possibles, à savoir, l'introduction de nouveaux animaux dans les cheptels, les entrées de consommables, substrats, produits et matériels, ainsi que les flux de personnels et intervenants.

Au sein de l'écloserie, la production des alevins est assurée dans des conditions biosécurisées. C'est-à-dire que des mesures préventives standardisées sont mises en place afin de réduire le risque infectieux. Les intrants et substrats sont ainsi traités ou contrôlés pour s'assurer qu'ils sont indemnes de microorganismes pathogènes. En aquaculture, la principale voie d'entrée des pathogènes est l'eau de mer utilisée pour les élevages. Celle-ci est donc filtrée jusqu'à 10 microns par un système de filtre à sable puis sur membrane. Elle est ensuite désinfectée avec une lampe à rayonnements ultraviolets. Un pédiluve ainsi qu'un poste de désinfection des mains sont positionnés à l'entrée de l'écloserie à l'intention de tout intervenant entrant en zone biosécurisée. Un vide sanitaire est systématiquement effectué à

l'issue d'un cycle de production. Il consiste en un nettoyage et une désinfection par chloration, suivi du séchage des installations et du matériel. Un temps d'assec, sans entrée de personnel, est respecté pendant deux semaines.

- La gestion et le suivi sanitaire des lots de reproducteurs

Chaque géniteur est identifié par un transpondeur électronique de type *Pit-tag*, utilisant la technologie des radiofréquences (*radio frequency identification* ou RFID) ce qui permet un suivi individuel des animaux. Seuls les individus indemnes de pathogènes sont conservés dans les lots de reproducteurs. Ils sont élevés en conditions biosécurisées dans une eau de mer filtrée à 10µm et dont les microorganismes sont éliminés par exposition aux rayonnements ultraviolets.

Avant l'introduction d'un nouvel animal dans le lot, celui-ci est isolé dans une zone de quarantaine et des prélèvements de gamètes sont réalisés pour analyse. Un traitement de prophylaxie pour éliminer les ectoparasites potentiellement portés est systématiquement réalisé. La détection du nodavirus l'agent de l'encéphalopathie et rétinopathie virale est faite sur les échantillons de gamètes à l'aide d'un kit commercial Mini-Array de Skuld-tech. S'agissant d'un virus à ARN, les étapes préliminaires d'extraction d'ARN et de rétrotranscription de cet ARN en ADN sont indispensables. Le kit utilise la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et le couple d'amorces utilisé (F1 : 5'-ACACTGGAGTTTGAAATTCA et R2 : 5'-GGCAGCAGGATTTGACGGGGCTGC) est commun aux souches connues de nodavirus (David et al. 2010). Un contrôle interne, constitué d'une séquence conservée codant pour l'ARN 18S du poisson, est utilisé dans chaque réaction. La visualisation du résultat est faite par révélation colorimétrique des produits d'amplification hybridés sur les membranes de nylon du kit. Le kit peut être utilisé sur divers types de prélèvements (ovocyte, tégument, cerveau, larves, œufs) et pour plusieurs espèces de poissons (Cobia, Platax, Ombrine, *Lates calcarifer*). Il permet ainsi la détection éventuelle du virus à partir de prélèvements non destructifs (gamètes, prélèvement de tégument à partir de la nageoire caudale). Les individus diagnostiqués positifs sont sacrifiés et ceux présentant un résultat négatif sont introduits dans les lots de reproducteurs en zone de maturation (David et al. 2008).

Afin de limiter l'apparition d'ectoparasitoses dans les lots de reproducteurs, une procédure préventive est réalisée tous les trois mois. Les individus sont immergés dans un bain d'eau douce, une observation directe du corps et des branchies est réalisée, suivie d'un

transfert en bassin de dessalure entre 10 et 15‰ pendant sept jours. Au besoin, le traitement est poursuivi. Un contrôle du statut indemne des reproducteurs pour le nodavirus est effectué chaque année. Ce suivi sanitaire des lots de géniteurs était réalisé à partir d'un échantillon de nageoire caudale, et depuis l'ouverture de l'écloserie, il est également fait par échantillonnage des larves dans les premiers jours suivant l'éclosion.

- Un contrôle de chaque cycle de production

Au cours des cycles de production en écloserie, un suivi rigoureux des paramètres biologiques (croissance, survie, indice de conversion, comportement, présence éventuelle de pathogènes) et environnementaux (état du milieu d'élevage, température de l'eau, turbidité de la colonne d'eau, oxygène dissous, pH) est mis en place. Un suivi zootechnique et zoosanitaire similaire est assuré par les éleveurs dans les fermes privées.

Depuis 2018, un contrôle systématique du statut sanitaire des alevins est effectué sur chaque cycle de production avant la livraison des poissons dans les fermes de grossissement. Les principaux agents pathogènes contrôlés sont le nodavirus, *Tenacibaculum maritimum* et *Vibrio harveyi*.

Suite à des épisodes de mortalité répétés au début de l'année 2021, un suivi régulier est réalisé pour la détection du nodavirus depuis le jour de la ponte jusqu'au 13^{ème} jour suivant la ponte. Trois prélèvements de cents œufs sont réalisés le jour de la ponte (J0), puis trois prélèvements de 10 larves sont analysés au 3^{ème} jour, puis au 7^{ème} ou 8^{ème} jour et entre le 11^{ème} et le 13^{ème} jour après celle-ci.

A la fin de chaque cycle en écloserie, cinq poissons sont échantillonnés individuellement pour un prélèvement tégumentaire. Une analyse par PCR quantitative en temps réel (qPCR) est effectuée pour détecter l'agent *Tenacibaculum maritimum* selon la méthode décrite par Fringuelli et ses collaborateurs en 2012 (Fringuelli et al. 2012). La détection de *Vibrio harveyi* est réalisée avec la même analyse de laboratoire selon la méthode décrite par Schikorski et ses collaborateurs en 2013 (Schikorski et al. 2013).

En parallèle, un isolement par culture sur milieu sélectif Marine Agar (DIFCO) a été mis en place depuis 2019. La composition précise de ce milieu de culture est soumise à un accord de confidentialité avec le laboratoire privé LABOFARM localisé à Loudéac, France. Cette technique d'isolement est une étape du procédé d'identification des espèces du genre *Tenacibaculum* potentiellement pathogènes qui seraient présentes au cours des cycles d'élevage en écloserie. Les colonies observées sont isolées par repiquage sur milieu sélectif

puis caractérisées par PCR ciblant *Tenacibaculum maritimum* selon la méthode décrite par Fringuelli et ses collaborateurs en 2012 (Fringuelli et al. 2012), ou bien analysées par séquençage d'une région du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. Les résultats des analyses de laboratoire étant obtenus une semaine après les prélèvements de fin de cycle de production en écloserie, c'est l'observation de signes cliniques ou de lésions tégumentaires qui est déterminante dans la décision d'effectuer ou de reporter le transfert des poissons vers les fermes d'élevage.

Une analyse de l'eau des bassins d'élevage par qPCR pour rechercher *T. maritimum* et *Vibrio harveyi*, après filtration à 0.22µm, est également faite depuis l'année 2019. Les prélèvements analysés proviennent de l'eau d'entrée des bassins de géniteurs, l'eau de récolte des œufs, l'eau avant la filtration mécanique et la désinfection aux UV en écloserie, l'eau d'entrée et dans les bassins larvaires ainsi que l'eau d'entrée et dans les bassins d'alevinage.

II. La ténacibaculose

1. Présentation de la maladie

a) Distribution géographique de la ténacibaculose

La ténacibaculose, anciennement nommée flexibactériose, est une maladie majeure qui affecte de nombreuses espèces d'organismes marins domestiques et sauvages dans le monde entier. La maladie a été décrite majoritairement chez les poissons marins mais aussi chez certaines espèces d'échinodermes et de mollusques (Masuda et al. 2004 ; Burioli et al. 2018).

Le tout premier épisode infectieux de ténacibaculose est décrit au Japon dans des élevages de dorades japonaises (*Pagrus major*) et de dorades à tête noire (*Acanthopagrus schlegeli*) à la fin des années 70 (Masumura, Wakabayashi 1977). Peu de temps après en 1979, un article est publié sur le premier évènement observé en Europe avec l'infection de lots de soles (*Solea solea*) en Ecosse, au Royaume Uni (McVicar, White 1979). Les lésions de ténacibaculose sont ensuite décrites pour la première fois en France à partir de l'année 1990 dans des élevages de bar commun (*Dicentrarchus labrax*) sur la côte méditerranéenne (Bernardet et al. 1994). A la même période l'infection touche des élevages de turbots (*Scophthalmus maximus*) et de salmonidés en Galice, une région de la côte atlantique espagnole (Alsina, Blanch 1993). Dans l'hémisphère sud, la maladie est observée sur de nombreuses espèces d'intérêt commercial en Tasmanie (Handlinger et al. 1997) et Nouvelle-Zélande. Le continent américain regroupe également des foyers d'infection de ténacibaculose au sud de la côte californienne (Chen et al. 1995) ainsi qu'en Colombie britannique, au Canada (Ostland et al. 1999). La ténacibaculose est également responsable de pertes conséquentes dans les élevages de salmonidés. Elle touche notamment les productions du saumon d'Atlantique (*Salmo salar*), du saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) et de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au Chili (Avendaño-Herrera et al. 2020). Aujourd'hui, la maladie est retrouvée sur tous les continents pratiquant l'aquaculture.

b) L'étiologie de la maladie

Le terme ténacibaculose désigne tout phénomène infectieux dont l'agent étiologique identifié appartient au genre *Tenacibaculum* dans la famille des *Flavobacteriaceae* (phylum

Bacteroides). Au sein de cette famille, le genre *Flavobacterium* regroupe des espèces bactériennes isolées de poissons d'eau douce ou encore dans le sol, tandis que les agents décrits dans le genre *Tenacibaculum* sont majoritairement retrouvés sur des poissons marins (Bridel 2020).

A ce jour, 31 espèces sont décrites comme appartenant au genre *Tenacibaculum* (www.bacterio.net/tenacibaculum.html) et ont fait l'objet d'une validation. Huit d'entre elles sont des espèces bactériennes confirmées pathogènes par infection expérimentale pour des espèces de poissons marins et quelques autres espèces aquatiques, dont un organisme bivalve (Burioli et al. 2018) et une espèce d'échinodermes (Masuda et al. 2004). Il s'agit de *Tenacibaculum maritimum* (Baxa et al. 1987), *Tenacibaculum soleae* (López et al. 2010), *Tenacibaculum discolor* et *Tenacibaculum gallaicum* (Piñeiro-Vidal et al. 2007 ; M. Piñeiro-Vidal et al. 2008), *Tenacibaculum dicentrarchi* (Avendaño-Herrera et al. 2016), *Tenacibaculum finnmarkense* (Småge et al. 2018), *Tenacibaculum ovolyticum* (Hansen et al. 1992) et *Tenacibaculum litopenaei* (Masuda et al. 2004 ; Sheu et al. 2007). Cette dernière est identifiée pathogène pour une espèce d'oursins *Strongylocentrotus intermedius*, plus spécifiquement. Plus récemment, une nouvelle espèce nommée *Tenacibaculum piscium*, qui serait très probablement pathogène pour des poissons marins d'élevage, a été isolée en Norvège (Olsen et al. 2020). En Polynésie française, la seule espèce pathogène du *Platax orbicularis* ayant été identifiée est *Tenacibaculum maritimum*. L'origine géographique des différentes espèces pathogènes de *Tenacibaculum* est indiquée dans la Figure 9. La ténacibaculose est une maladie retrouvée dans de nombreuses régions aquacoles à travers le monde et plus particulièrement dans les élevages de poissons marins.

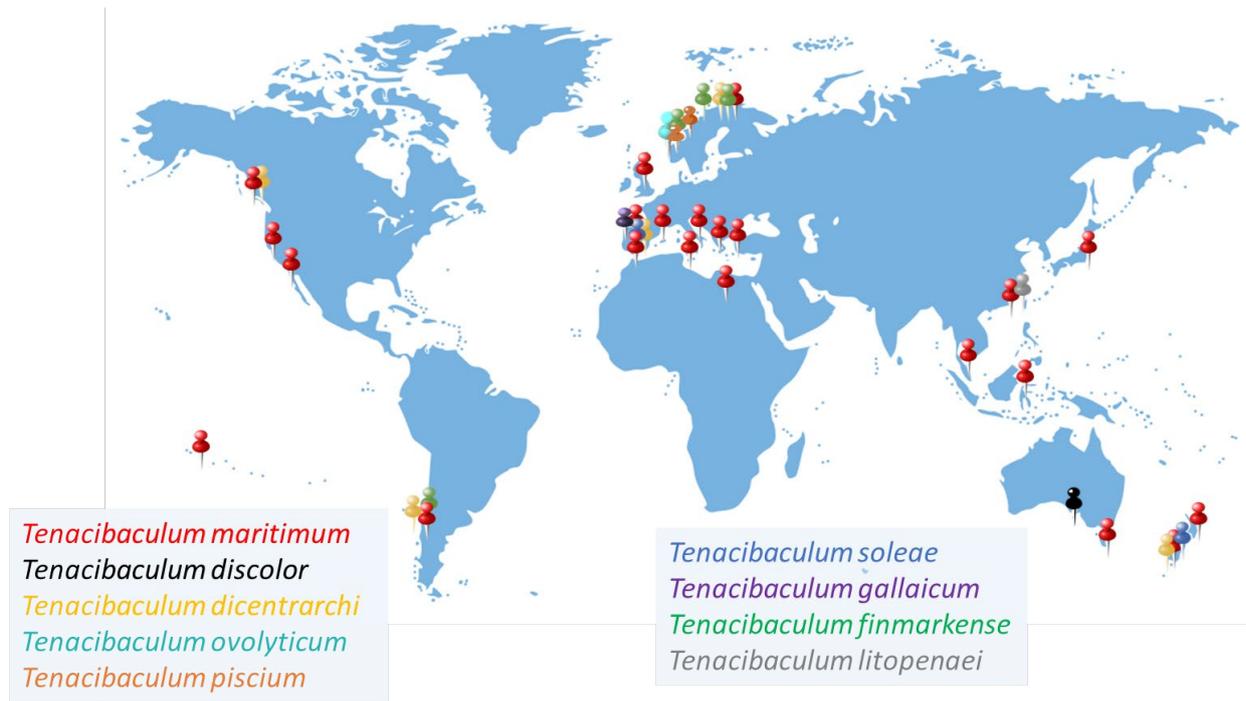


Figure 9 : Les zones de répartition des espèces pathogènes identifiées lors d'épisodes infectieux de ténacibaculose à travers le monde. Seuls sont représentés les cas de ténacibaculose ou l'agent pathogène a été isolé et *a minima* identifié sur la base de l'analyse de la séquence de l'ADN ribosomique 16S. (adaptée de Pierre LOPEZ)

c) Présentation clinique de la ténacibaculose

Les lésions observées les plus caractéristiques de la ténacibaculose sont des ulcères cutanés, une érosion de la bouche, des nageoires dites effilochées et une nécrose de la queue (McVicar, White 1979 ; Handler et al. 1997 ; Abdelaziz Abdelgalil, Hashem 2012) (Figure 10). La plupart du temps, le tableau clinique comprend aussi des symptômes non spécifiques, attestant d'une atteinte de l'état général : une perte d'appétit, un comportement apathique, une nage anormale et des difficultés respiratoires (Devesa et al. 2006 ; Abdelaziz Abdelgalil, Hashem 2012 ; Lopez et al. 2021).

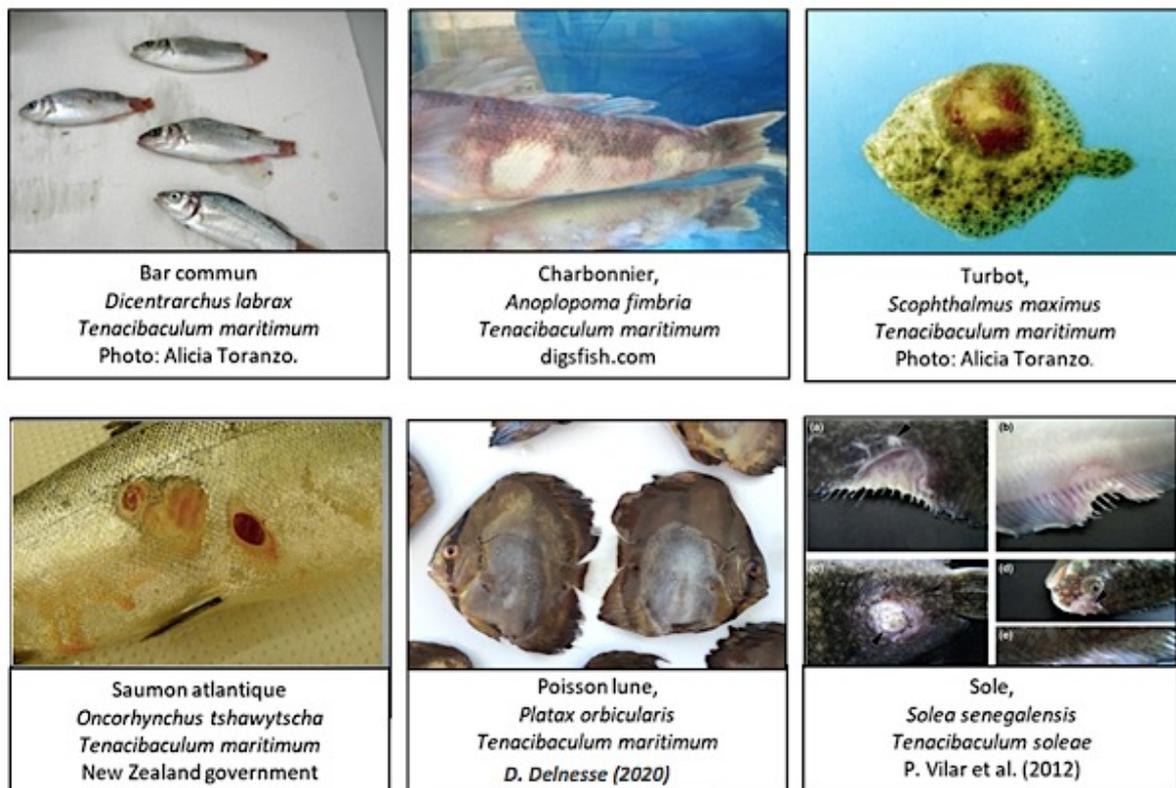


Figure 10 : Lésions externes de ténacibaculose sur différentes espèces de poisson d'élevage (d'après Pierre LOPEZ, données non publiées)

Différents noms ont été utilisés pour désigner la ténacibaculose à savoir la maladie à bactérie mucilagineuse des poissons d'eau salée, la stomatite bactérienne, le syndrome de la bouche érodée et la nécrose à plaques noires (Avendaño-Herrera et al. 2006b). On la nomme également myxobactériose de l'eau salée car les symptômes observés sont similaires à ceux retrouvés sur des poissons d'eau douce infectés par *Flexibacter columnaris* lors de columnariose.

Ces différentes dénominations trouvent leur origine dans des présentations cliniques et lésionnelles qui varient non seulement selon les espèces pathogènes du genre *Tenacibaculum* impliquées, mais aussi en fonction des organismes infectés et de leur stade physiologique (Baxa 1988a ; Chen et al. 1995 ; Abdelaziz Abdelgalil, Hashem 2012). Le lieu géographique de l'infection, son caractère naturel ou expérimental, et dans ce dernier cas le mode d'infection réalisé, sont aussi la source de tableaux cliniques différents (Avendaño-Herrera 2005).

A titre d'exemple pour une infection par l'espèce *T. maritimum*, la sardine du Pacifique est recouverte sur de larges zones du corps d'une pseudomembrane blanchâtre de bactéries motiles sans autres lésions visibles ni signes cliniques notables (Chen et al. 1995).

En Australie, sur les salmonidés des lésions et perforation de la cornée sont rapportées (Handler et al. 1997) tandis qu'en Colombie britannique, les saumons d'Atlantique présentent des lésions érosives de la bouche (Ostland et al. 1999).

Les lésions ulcératives du tégument sont parmi les plus documentées. Elles débutent généralement par la perte localisée d'écailles puis progressent rapidement. Elles s'étendent en profondeur du derme superficiel vers les couches musculaires plus profondes. Les tissus sont très hémorragiques et deviennent rapidement nécrotiques, prenant alors une teinte blanchâtre.

L'infection provoque un taux de mortalité variable, pouvant atteindre jusqu'à 70% à 100% du lot, lors d'infections expérimentales par *T. maritimum* (Wakabayashi, Hikida 1984 ; Baxa et al. 1987 ; Handler et al. 1997 ; Le Luyer et al. 2020). La mortalité observée diffère également selon l'espèce marine infectée, la souche utilisée, sa concentration et les conditions environnementales et zootechniques.

Les symptômes de ténacibaculose ne sont pas pathognomoniques d'un agent infectieux et peuvent être associés à une infection par divers autres micro-organismes. De plus, les lésions de ténacibaculose détruisent partiellement la barrière cutanée des individus ce qui favorise l'entrée d'autres agents pathogènes dans l'organisme des poissons, qui sont souvent retrouvés en co-infection. On retrouve notamment des bactéries appartenant au genre *Vibrio* ou des protozoaires ciliés comme *Trichodina* ou *Uronema marinum* (Chen et al. 1995 ; Handler et al. 1997).

2. L'espèce pathogène *Tenacibaculum maritimum*

a) L'agent étiologique *T. maritimum*

Tenacibaculum maritimum est l'agent de la ténacibaculose le plus documenté. Anciennement dénomé *Flexibacter maritimus* ou *Cytophaga marina*, c'est une bactérie filamenteuse à Gram négatif ayant une taille variant de 2 à 30µm de long (occasionnellement observé jusqu'à 100µm) par 0.5µm de large, qui est dotée d'une motilité par glissement et ne possède pas de flagelle. Elle a été retrouvée associée à plus de 30 espèces marines dans le monde (Nowlan et al. 2020). En effet, *Tenacibaculum maritimum* infecte plusieurs espèces de poissons comme la sole commune (*Solea solea*), le turbot (*Psetta maxima*), le saumon d'Atlantique (*Salmo salar*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus kisutch*), le bar

(*Dicentrarchus labrax*), la dorade royale (*Sparus aurata*), la sardine du Pacifique (*Sardinops sagax*), soit souvent des espèces présentant un fort intérêt économique (Mabrok et al. 2016).

Le tableau 3 ci-après recense les épisodes de ténacibaculose décrits à travers le monde pour lesquelles l'agent *T. maritimum* a été détecté sur des poissons téléostéens et chondrichthyens*. Cet agent pathogène a également été identifié chez certaines espèces de cnidaires dont *Pelagia noctiluca*, *Phialella quadrata* et *Muggiaea atlantica* (Delannoy et al. 2011; Fringuelli et al. 2012; Wade 2020).

40

*la classe des *chondrichthyens* rassemble les poissons possédant un squelette cartilagineux à calcifié. On y retrouve par exemple différentes espèces de raies et requins.

Tableau 3 : Exemples d'espèces de *Tenacibaculum maritimum* et leur origine géographique. (Adapté de Wade, Joy 2020)

Nom commun	Espèce	Pays	Référence
Acoupa blanc	<i>Atractoscion nobilis</i>	É.-U. (Californie)	Chen <i>et al.</i> (1995); Salati <i>et al.</i> (2005)
Anchois du Pacifique	<i>Engraulis mordax</i>	É.-U. (Californie)	Chen <i>et al.</i> (1995)
Bar Commun	<i>Dicentrarchus labrax</i>	France	Pepin et Emery (1993); Bernardet <i>et al.</i> (1994)
		Malte	Bernardet (1998)
		Italie	Salati <i>et al.</i> (2005)
		Grèce	Kolygas <i>et al.</i> (2012)
Baliste-Picasso clair	<i>Rhinecanthus assasi</i>	Ornemental	ICES (2019)
		Égypte	Abd El-Galil et Hashiem (2011)
Cardeau hirame	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Corée	Jang <i>et al.</i> (2009)
Céteau	<i>Dicologlossa cuneate</i>	Espagne	Chen <i>et al.</i> (1995); Lopez <i>et al.</i> (2009)
Denté commun	<i>Dentex dentex</i>	Italie	Salati <i>et al.</i> (2005)
Dorade à tête noire	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Japon	Masumura et Wakabayashi (1977); Wakabayashi <i>et al.</i> (1984); Wakabayashi <i>et al.</i> (1986)
Dorade japonaise	<i>Pagrus major</i>	Japon	Masumura et Wakabayashi (1977)
Dorade rose	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Espagne	Castro <i>et al.</i> (2007)
Dorade royale	<i>Sparus aurata</i>	Espagne, Italie	Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004a); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004c); Salati <i>et al.</i> (2005)
		Grèce	Kolygas <i>et al.</i> (2012)
Flet à dos vert	<i>Rhombosolea tapirine</i>	Australie	Soltani <i>et al.</i> (1996) ; Handler <i>et al.</i> (1997)
Flet japonais	<i>Paralichthys olivaceous</i>	Japon	Baxa <i>et al.</i> (1986)
Flétan noir	<i>Scophthalmus maximus</i>	Espagne	Devesa <i>et al.</i> (1989); Alsina et Blanch (1993); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004a); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004c)
		Chili	Bernardet (1998); Lopez <i>et al.</i> (2009)
		France	Habib <i>et al.</i> (2014)
		Norvège	Olsen <i>et al.</i> (2017)
		Italie	Magi <i>et al.</i> (2007)
Grondin perlon	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Italie	G. Magi (données non disponibles dans Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2006d))
Limande à queue jaune	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japon	Baxa <i>et al.</i> (1988b, 1988a); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2006d)
Lompe	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Norvège	Småge <i>et al.</i> (2016)
Mulet à oeil jaune	<i>Aldrichetta forsteri</i>	Australie	Handler <i>et al.</i> (1997)
Pagre picnic	<i>Acanthopagrus butcheri</i>	Australie	Handler <i>et al.</i> (1997)
Perche barramundi ou Lou tropical	<i>Lates calcarifer</i>	Singapour	Labrie (2008)
		Australie	Soltani <i>et al.</i> (1996)
Platax rond	<i>Platax orbicularis</i>	Polynésie	Saulnier <i>et al.</i> (2016)

		française	
Poisson-demoiselle noir	<i>Neoglyphieodon meles</i>	Ornemental	ICES (2019)
		Égypte	Abd El-Galil et Hashiem (2011)
Poisson-globe japonais	<i>Takifugu rubripes</i>	Japon	Rahman <i>et al.</i> (2014)
Poisson rayé à mâchoire tranchante (« ishidaï »)	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Japon	Wakabayashi <i>et al.</i> (1986)
Requin-taureau	<i>Carcharias taurus</i>	Italie	Salati <i>et al.</i> (2005); Florio <i>et al.</i> (2016)
Sar commun	<i>Diplodus sargus</i>	Italie	Salati <i>et al.</i> (2005)
Sar à museau pointu	<i>Diplodus puntazzo</i>	Italie	Salati <i>et al.</i> (2005)
Sardine du Pacifique	<i>Sardinops sagax</i>	É.-U. (Californie)	Chen <i>et al.</i> (1995)
Saumon atlantique	<i>Salmo salar</i>	Espagne	Pazos <i>et al.</i> (1993) dans Ferguson <i>et al.</i> (2010)
		Australie	Soltani et Burke (1994); Handlinger <i>et al.</i> (1997); Powell <i>et al.</i> (2004)
		Canada (C.-B.)	Hicks (1989); Kent (1992); Ostland <i>et al.</i> (1999); Frisch <i>et al.</i> (2017)
		Chili	Apablaza <i>et al.</i> (2017)
		Écosse	Ferguson <i>et al.</i> (2010)
		États-Unis (Washington)	Frelier <i>et al.</i> (1994)
		Norvège	PHARMAQ-Analytiq, 2017
		Irlande	Downes <i>et al.</i> (2018)
Saumon chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	É.-U. (Californie)	Chen <i>et al.</i> (1995)
		Nouvelle-Zélande	Brosnahan <i>et al.</i> (2018)
Saumon coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Canada	Nekouei <i>et al.</i> (2019)
Saumon rouge	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Canada	Nekouei <i>et al.</i> (2018)
Sole commune	<i>Solea solea</i>	Royaume-Uni	McVicar et White (1979, 1982); Bernardet <i>et al.</i> (1990)
		Pays-Bas	Habib <i>et al.</i> (2014)
		Espagne	Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004b)
Sole sénégalaise	<i>Solea senegalensis</i>	Portugal	Cepeda et Santos (2002); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004c); Avendaño-Herrera (2005)
		Espagne	Cepeda et Santos (2002); Avendaño-Herrera <i>et al.</i> (2004c); Avendaño-Herrera (2005)
Trompette rayé	<i>Latris lineata</i>	Australie	Carson <i>et al.</i> (1992); Handlinger <i>et al.</i> (1997)
Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Australie	Soltani <i>et al.</i> (1996); Handlinger <i>et al.</i> (1997)
		États-Unis (Washington)	Frelier <i>et al.</i> (1994)
Vieille balayette	<i>Cheilinus lunulatus</i>	Égypte	Abd El-Galil et Hashiem (2012)

b) Ecologie de l'agent infectieux *T. maritimum*

▪ Réservoirs et modes de transmission du pathogène

Les réservoirs naturels de *T. maritimum*, comme ses modes de transmission, restent à ce jour incertains. Les hypothèses émises sur les voies d'infection du pathogène portent sur le contact direct entre les hôtes, la transmission indirecte par l'eau de mer ou encore la voie de l'ingestion alimentaire (Mitchell, Rodger 2011). *Tenacibaculum maritimum* peut être isolée de prélèvements d'eau de mer, de sédiment et de matériel biologique se développant sur les structures d'élevage ayant été en contact avec des poissons infectés (Santos et al. 1999).

Tenacibaculum maritimum est une bactérie capable de former des biofilms sur les surfaces dures (Frisch et al. 2018a ; 2018b). Récemment, dans un travail visant à comprendre le rôle des biofilms dans la transmission des pathogènes, Levipan et ses collaborateurs suggèrent que les structures inertes utilisées en aquaculture peuvent servir de réservoir transitoire pour *T. maritimum* (Levipan et al. 2019).

Différentes espèces d'organismes marins sont aussi suspectées de servir de vecteur ou de réservoir à la bactérie, comme certaines espèces de méduses (Delannoy et al. 2011 ; Fringuelli et al. 2012 ; Wade 2020) ou encore le poux de mer (*Lepeophtheirus salmonis*) (Nowlan 2020). Ces derniers, comme d'autres poissons sauvages porteurs de l'agent pathogène, peuvent donc transmettre la bactérie aux animaux d'élevage des structures en pleine mer et en zone lagunaire. En outre, Ferguson et ses collaborateurs ont mis en évidence que les méduses comme *Phialella quadrata* ont très probablement un rôle de vecteur de pathogènes pour les saumons d'élevage (Ferguson et al. 2010). Elles seraient capables de pénétrer dans les cages d'élevage et d'atteindre la bouche des animaux où elles libèreraient des toxines et des pathogènes dont *T. maritimum*. De plus, en Tasmanie, *T. maritimum* a été retrouvé sur des lots de trompette rayés (*Latris lineata*) ayant déclaré des lésions de ténacibaculose rapidement après leur capture en milieu naturel (Handler et al. 1997).

Bien qu'Avendaño-Herrera et ses collaborateurs démontrent que la bactérie ne peut survivre *in vitro* plus de cinq jours dans de l'eau de mer récoltée, ils n'excluent pas qu'elle puisse être viable dans le milieu naturel. Dans le cadre de cette étude, *T. maritimum* est restée cultivable pendant cinq mois dans de l'eau de mer stérile ce qui suggère plutôt l'existence d'une inhibition du pathogène par les microorganismes du milieu (Avendaño-Herrera et al. 2006a). En revanche, la transmission horizontale de la bactérie dans l'eau de mer a bien été démontrée par Frisch et ses collaborateurs (Frisch et al. 2018a). L'expérience consistait à

mettre en contact des poissons ayant été contaminés avec *T. maritimum* par immersion, avec des poissons naïfs. Trois souches différentes de la bactérie ont été utilisées. La quasi-totalité des poissons ayant été contaminés par immersion sont morts au cours de l'expérience ainsi qu'en moyenne 68% des poissons mis au contact des animaux infectés. Des différences de mortalité ont été observées en fonction de la souche utilisée. Avendano-Herrera suggère que *T. maritimum* pourrait également faire partie des bactéries commensales présentes sur la peau des poissons et rester dans le mucus des animaux qui ferait office de réservoir (Avendaño-Herrera 2005).

- Etude du microbiote des poissons infectés

Dans certains études, des flavobactéries et notamment des espèces du genre *Tenacibaculum* ont été identifiées sur la peau saine de saumons élevage (Karlsen et al. 2017). Par ailleurs, plusieurs maladies en aquaculture sont associées à des modifications importantes de l'écosystème microbien des animaux ce qui peut favoriser la croissance de micro-organismes pathogènes. Ce phénomène de dysbiose a notamment été observé lors d'infections de ténacibaculose. L'agent *T. maritimum* pourrait déclencher la maladie de façon opportuniste suite à une modification du microbiote de l'hôte et une fonction immunitaire réduite, par exemple avec l'intermédiaire de facteurs de stress. Etudier la composition du microbiote des poissons sains et de poissons infectés par la ténacibaculose est un axe de recherche d'intérêt à visée diagnostique comme dans l'objectif d'améliorer la compréhension de la maladie.

Wynne et ses collaborateurs ont étudié le microbiote de saumons d'Atlantique touchés par le syndrome de la pourriture de la bouche lors d'une infection naturelle en Colombie Britannique, au Canada (Wynne et al. 2020). Les flavobactéries représentaient 91% des communautés bactériennes portées par les animaux ayant présenté des signes de stomatite. Le genre *Tenacibaculum* ainsi que, plus précisément, l'espèce *T. maritimum* étaient les plus abondants, même si d'autres espèces du genre ont pu être identifiées à une très faible abondance dont *T. dicentrarchi* et *T. ovolyticum*. La présence de ces taxons en abondance importante a permis de confirmer le diagnostic de ténacibaculose. En outre, un grand nombre d'espèces du genre *Vibrio* étaient plus abondantes chez les poissons symptomatiques et chez certains poissons ayant survécu à l'infection, que chez les poissons identifiés comme cliniquement sains. Ces derniers ont quant à eux présenté une abondance plus élevée de Streptocoques. Après l'épizootie, les populations de cyanobactéries et de *Planctomycetacia* ont semblé diminuer tandis que celles d'actinobactéries ont augmenté. Les poissons survivants, par rapport aux poissons cliniquement sains, portaient un plus grand nombre de

Geobacillus, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Les échantillons d'eau quant à eux présentaient une très faible abondance de *T. maritimum*. Les résultats de l'étude pourraient suggérer que les souches bactériennes du genre *Vibrio* jouent un rôle dans les symptômes observés. Egalement, les taxons observés en abondance notable sur les poissons survivants pourraient avoir contribué à la résistance de ces animaux à l'infection.

Ce déséquilibre de la flore bactérienne commensale des poissons a également été observé dans une autre étude menée par Miyake en 2020 sur des perches barramundi, aussi nommées bars asiatiques (*Lates calcarifer*). Il observe des différences dans le microbiote de poissons sains et de poissons symptomatiques mais aussi entre des animaux infectés naturellement ou expérimentalement (Miyake et al. 2020). Il est important de signaler que l'infection expérimentale n'a pas consisté à inoculer le pathogène directement aux animaux par injection ou balnéation. Elle a consisté en une mise au contact de poissons indemnes avec des animaux ayant présenté des signes évocateurs de ténacibaculose, dont la composition du microbiote n'était alors pas connue. Les résultats obtenus indiquent que la flore intestinale des bars asiatiques malades en infection naturelle et expérimentale, se compose de 85% de protéobactéries alors que celle des poissons sains est plus diversifiée avec 49% de protéobactéries et 33% de firmicutes. Le genre *Vibrio* est dominant au sein des protéobactéries chez les poissons infectés. Il est intéressant de constater que le genre *Vibrio* a été isolé majoritairement du tégument des poissons en infection expérimentale alors qu'il est retrouvé dans les mêmes proportions que *T. maritimum* pour les poissons infectés naturellement. Il a aussi été démontré précédemment qu'en condition de co-infection avec d'autres micro-organismes viraux, bactériens ou parasitaires, les bactéries du genre *Vibrio* pouvaient augmenter la sévérité de la maladie (Kotob et al. 2016).

D'autres études évoquent la possibilité que certaines souches de *Tenacibaculum* inhibent de façon compétitive les autres bactéries d'un milieu. Par exemple la souche de *Tenacibaculum sp.* 20J produit une acylhomosérine lactonase (AHL) qui permet d'inhiber le *quorum sensing** d'autres bactéries. *In vitro*, cette enzyme est capable d'inhiber la croissance de colonies virulentes d'*Escherichia coli* (Mayer et al. 2015). Des extraits cellulaires de la souche *Tenacibaculum* 20J comme l'enzyme AHL directement extraite de cette souche, ont aussi réduit la capacité de *Streptococcus mutans* à former des biofilms (Muras et al. 2018). L'inhibition du *quorum sensing** de bactéries pathogènes aquacoles comme *Edwardsiella tarda* a été vérifiée *in vitro* à partir d'extraits cellulaires de la souche *Tenacibaculum* 20J

*Le *quorum sensing* se définit par l'aptitude d'un micro-organisme à coordonner l'expression de certains gènes (virulence, résistance aux antimicrobiens, formation de biofilms) en fonction de sa densité cellulaire.

(Romero et al. 2014). Il est également possible que *T. maritimum* agisse par une autre méthode de compétition comme limiter l'accès des autres bactéries aux nutriments.

c) Pathogénicité de *Tenacibaculum maritimum*

Le tableau clinique et le taux de mortalité d'un épisode de Ténacibaculose dépend fortement de l'espèce du genre *Tenacibaculum* impliquée mais aussi de l'espèce et de l'âge des poissons infectés (McVicar, White 1979 ; Handler et al. 1997 ; Toranzo et al. 2005 ; Avendaño-Herrera, Magarinos, et al. 2005). Les facteurs environnementaux (augmentation de la salinité et température de l'eau, période de sécheresse prolongée) ainsi que les pratiques d'élevage (facteurs de stress, lésions traumatiques, compétition pour l'aliment) ont également une influence sur la sévérité et la cinétique de l'épisode infectieux (Handler et al. 1997 ; Frisch et al. 2017 ; 2018a).

La pathogénicité d'une bactérie est caractérisée par sa capacité à coloniser les tissus de l'organisme-hôte et à s'y multiplier ainsi que sa faculté à provoquer la maladie. De nombreux facteurs de virulence peuvent influencer sur le pouvoir pathogène du microorganisme comme la capacité d'adhérence, celle à former des biofilms, à séquestrer le fer, à pénétrer l'épithélium, l'échappement immunitaire, la capacité à survivre et se multiplier dans les phagocytes, sa résistance à l'activité bactéricide du complément, la synthèse de cytotoxines, de facteurs anti-phagocytose ou encore la possession d'une capsule (Avendaño-Herrera 2005 ; Pérez-Pascual et al. 2017).

Tenacibaculum maritimum est une bactérie capable de former des biofilms (Frisch et al. 2018a ; 2018b). Van Gelderen et ses collaborateurs ont également écrit que la pathogénicité et la virulence de *T. maritimum* semblent être renforcées chez les souches les plus adhésives (van Gelderen et al. 2010). La bactérie semble posséder une certaine résistance contre l'action bactéricide du mucus auquel elle est fortement adhérente (Magariños et al. 1995). Celui-ci pourrait agir comme une enveloppe protectrice pour *T. maritimum*, la protégeant contre les mécanismes d'agression des autres microorganismes présents sur les poissons (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*) et pour lesquels il conserverait un pouvoir antimicrobien (Avendaño-Herrera 2005).

De nombreux travaux ont porté sur le sujet de la pathogénicité de *T. maritimum*. La bactérie y est inoculée par infection expérimentale à des poissons de différentes espèces et d'âge divers, à des concentrations variables en bactéries et par des techniques d'administration variées : immersion ou balnéation, application directe dans la bouche,

application directe sur le pédoncule caudal, injection sous-cutanée, injection intramusculaire, injection intrapéritonéale, scarification avec ou sans répartition du pathogène sur le tégument (Masumura, Wakabayashi 1977 ; Wakabayashi, Hikida 1984 ; Baxa et al. 1987 ; Bernardet et al. 1994 ; Handlinger et al. 1997 ; Powell et al. 2004 ; van Gelderen 2007). Bien que cela rende la comparaison de ces études entre-elles délicate, elles donnent des indications sur les modalités de l'infection qui restent très peu connues pour cette maladie. Les taux de mortalité sont supérieurs lorsque la voie d'entrée du pathogène est mucoale, cutanée ou sous-cutanée tandis que les injections intramusculaires ou intrapéritonéales ne permettent pas d'induire la maladie de façon représentative. En effet, les lésions cutanées sont très peu identifiées à l'échelle macroscopique et microscopique en cas d'infection par injection intrapéritonéale tandis que des atteintes des organes internes sont facilement identifiées. *A contrario*, les inoculations par balnéation ou par injections dans les tissus cutanés et sous-cutanés permettent une reproduction du tableau lésionnel plus fidèle à celui d'une infection naturelle, avant tout au niveau du tégument (Faílde et al. 2013 ; Wakabayashi, Hikida 1984).

Dans un second temps, les analyses histologiques de ces travaux mettent en évidence de très rares cellules immunitaires. Cela suggère l'existence d'exotoxines excrétées par *Tenacibaculum maritimum* qui permettraient d'atténuer les défenses immunitaires de l'organisme (Soltani et al. 1995). Les toxines extracellulaires peuvent être spécifiques de l'espèce de micro-organisme qui les produit comme la ciguatoxine de la microalgue *Gambierdiscus toxicus* ou encore la toxine tétanique de la bactérie *Clostridium tetani*. Baxa et ses collaborateurs ont étudié de nombreuses toxines extracellulaires, endotoxines et enzymes associées à la pathogénicité de *T. maritimum* (Baxa 1988a). Comme l'équipe de van Gelderen près de vingt ans plus tard, ils ont observé que l'injection d'exotoxines par voie intrapéritonéale ne permet pas d'induire les lésions cutanées caractéristiques de la ténacibaculose, mais provoque des lésions hémorragiques et nécrotiques sur les organes internes (tube digestif, foie, rate, reins, cœur, branchies) et un fort taux de mortalité (Figure 11). La sévérité de la maladie est corrélée à la dose de toxines administrée aux poissons (Baxa 1988a ; van Gelderen 2007).

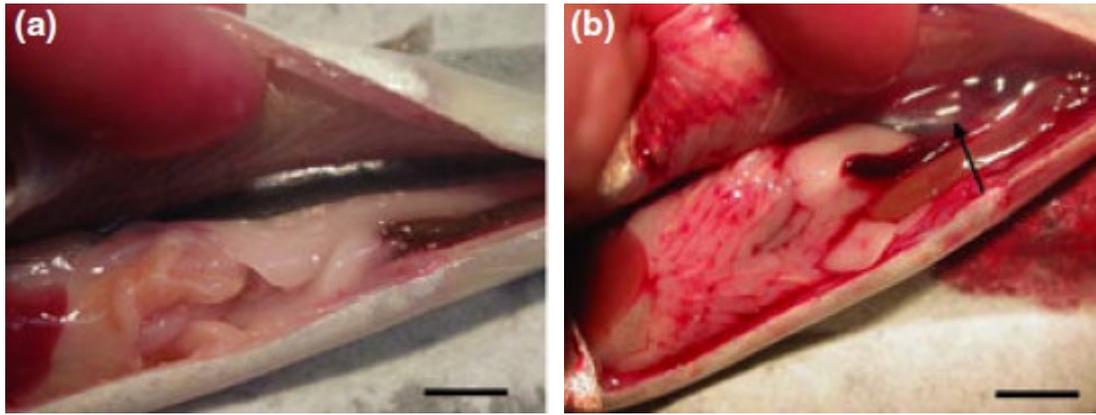


Figure 11 : Observation des organes internes de la cavité péritonéale de saumons de l'Atlantique au cours d'une étude expérimentale sur les exotoxines de *Tenacibaculum maritimum* (R. van Gelderen et al. 2009)
 (a) saumon du groupe contrôle (b) saumon 3h après injection intrapéritonéale de 1mg de produits extracellulaires de *T. maritimum*. On observe des lésions hémorragiques, une hypertrophie généralisée des organes internes et une hyperinflation de la vessie natatoire. Le foie est pâle et la rate est ferme et rigide.

La capacité à capturer le fer est un autre mécanisme de virulence mis en jeu lors du processus d'infection par *T. maritimum*. Elle lui permet de croître et de se multiplier à partir du fer disponible dans l'organisme hôte. Le fer est majoritairement lié aux protéines d'hémoglobine, de myoglobine, de ferritine, d'hémosidérine, de transferrine, de lactoferrine ou il est retrouvé dans des hèmes libres. En 2005, Avendaño-Herrera et ses collaborateurs mettent en évidence deux mécanismes de captation du fer chez *T. maritimum* à savoir la sécrétion de sidérophores qui sont des chélateurs de fer et la captation de l'hème par des protéines membranaires (Avendaño-Herrera 2005). Puis en 2017, l'équipe scientifique de Pérez-Pascual identifie plusieurs gènes dans le génome de *T. maritimum* probablement impliqués dans ces deux mécanismes de captation du fer (Pérez-Pascual et al. 2017).

La virulence d'une bactérie peut aussi être évaluée par une étude transcriptomique. On s'intéresse alors au profil d'expression différentielle de certains gènes, identifiés en génomique comme pouvant être à l'origine de la synthèse de molécules participant à des mécanismes de virulence. Cependant le génome complet de *T. maritimum* ayant été séquencé récemment, en 2017, par l'équipe de Pérez-Pascual, peu d'informations ont été acquises sur les gènes de virulence de cet agent infectieux (Pérez-Pascual et al. 2017). Une étude menée au sein du centre Ifremer par Le Luyer et son équipe, s'est intéressée à l'interaction hôte-pathogène entre *Tenacibaculum maritimum* et le *Platax orbicularis* au cours d'une infection expérimentale (Le Luyer et al. 2020). Dans le cadre de cette étude, l'expression des gènes de *T. maritimum* durant l'infection étaient comparée à celle de la même souche bactérienne cultivée *in vitro* (métabolisme basal). *In vivo*, ces auteurs ont notamment constaté une sur-expression des gènes impliqués dans le processus de catabolisme des glucanes, la synthèse de

la partie externe de la structure d'encapsulation, la reconnaissance de structures polymériques telles que les polysaccharides ou peptidoglycanes et le procédé de catabolisme des antibiotiques. Ces mécanismes mettent en jeu des gènes déjà suspectés de jouer un rôle dans la virulence de la bactérie. Plus précisément, le gène *katG* codant pour l'enzyme catalase-peroxydase, les gènes *sus-C* et *sus-D* impliqués dans la dégradation et l'utilisation de polysaccharides tels que les acides sialiques retrouvés en abondance sur le mucus des poissons ou encore des gènes impliqués dans la synthèse du récepteur membranaire Ton-B, ayant un rôle dans l'acquisition de fer, un élément nécessaire à la croissance bactérienne. En parallèle, de nouveaux gènes ont été identifiés qui seraient susceptibles de constituer des facteurs de virulence impliqués dans les interactions et l'intégrité de la membrane de l'hôte. Il s'agit notamment des gènes codant l'ulilysine, la streptopaïne, la toxine pneumolysine et les lipoprotéines ou adhésines associées aux peptidoglycanes. Cette étude expérimentale vient ainsi confirmer l'implication, en condition d'infection, de plusieurs gènes qui ont été identifiés comme associés dans des mécanismes de virulence, exclusivement à partir de l'analyse du génome.

3. Les méthodes de diagnostic

a) Le diagnostic différentiel des lésions ulcéraives de ténacibaculose

Lors de la survenue d'un épisode infectieux, une analyse approfondie des symptômes constatés, des lésions externes observées et du taux de mortalité dans les lots d'élevage permet d'émettre des hypothèses sur les agents infectieux impliqués. L'évocation des différents micro-organismes capables d'engendrer des signes cliniques similaires, en confrontation avec leur incidence épidémiologique, permet d'orienter le diagnostic. Le tableau 4 ci-après présente le diagnostic différentiel du symptôme le plus caractéristique de la ténacibaculose, à savoir les lésions ulcéraives. Il indique également si l'agent pathogène impliqué a été identifié comme une menace pour l'aquaculture locale en Polynésie française.

Tableau 4 : Diagnostic différentiel des maladies ulcératives des poissons d'eau de mer et incidence des pathogènes impliqués en Polynésie française (Noga 2000 ; Van Cam 2009).

Nature du microorganisme	Agent infectieux	Pathogène identifié comme une menace pour l'aquaculture en Polynésie française (Oui/Non)
Virus	Lymphocystivirus ¹	Oui
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Non
Bactérie	<i>Clostridium</i>	Non
	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Non
	<i>Edwardsiella tarda</i>	Non
	<i>Enterococcus (Streptococcus)</i>	Oui (<i>Streptococcus iniae</i>)
	<i>Flexibacter/Cytophaga spp</i>	Oui (<i>Tenacibaculum spp.</i>)
	Autres <i>Flavobacterium</i>	Non
	<i>Moraxella</i>	Non
	<i>Aeromonas motiles</i>	Non
	<i>Mycobacterium</i>	Non
	<i>Nocardia-like</i>	Non
	<i>Photobacterium damsela subsp. Piscicida (Pasteurella piscicida)</i>	Non
	<i>Plesiomonas</i>	Non
	<i>Pseudomonas</i>	Non
	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Non
	<i>Vibrio</i>	Oui (<i>V. harveyi</i> et <i>V. anguillarum</i>)
	<i>Yersinia ruckeri</i>	Non
	Epitheliocystis (Chlamydia-like)	Oui
Champignon	<i>Exophiala</i> (levure)	Non
	<i>Ochroconis</i>	Non
Mésomycétozoaire	<i>Ichthyophonus hoferi</i>	Non
Oomycètes	<i>Aphanomyces</i> (ulcerative mycosis)	Oui (<i>Aphanomyces invadans</i>)
	<i>Saprolegnia</i> (« Typical » saprolegniosis)	Non
	<i>Saprolegnia</i> (ulcerative mycosis)	Non
Protozoaire	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Oui
	<i>Brooklynella hostilis</i>	Oui
	<i>Chilodonella</i>	Non
	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Oui
	<i>Dermocystidium</i>	Non
	<i>Heteropolaria/Epistylis</i>	Non
	<i>Ichtyobodo necator</i>	Non
	<i>Tetrahymina</i>	Non
	<i>Trichodina</i>	Oui
	<i>Uronema marinum</i>	Non
Métazoaire	Stade métacercaire de trématodes digènes	Non
	Poux du poisson (<i>Argulus</i>)	Non
	Lamproies	Non
	Sangsues	Non
	Vers d'ancrage (Copépodes <i>Lernaea</i>)	Non
	Vers monogènes	Oui (<i>Neobenedenia sp</i> et <i>Benedenia sp</i> , <i>Diplectanum</i> et <i>Pseudorhabdosynochus</i>)
	Myxozoaires	Non
	Vers plats <i>Turbellaria</i>	Non
Divers	Larves de glochidie (mollusques)	Non

¹ Plusieurs autres maladies virales sont associées à des lésions cutanées hémorragiques ou d'hyperplasie dont certaines prédisposent le poisson à développer des lésions ulcératives secondaires en cas de surinfection par d'autres agents pathogènes.

b) Diagnostic nécropsique et histologique

▪ L'autopsie de poissons échantillonnés

Dans le cadre de la démarche diagnostique, des poissons des lots atteints sont échantillonnés et des prélèvements sont effectués en fonction des maladies suspectées. Il est possible de réaliser un prélèvement rapide par frottis ou raclage tégumentaire des lésions externes pour une observation directe des micro-organismes présents sur l'étalement frais au microscope photonique. Cela peut permettre d'orienter la recherche plus précisément vers une catégorie de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires) mais ne permet pas d'identifier précisément l'agent infectieux. En cas de ténacibaculose, on observe des bactéries en forme de bâtonnets dotées d'une motilité par glissement de l'ordre de 2 à 30µm de long (Figure 12).



Figure 12 : Observation directe, au microscope optique (x1000), de bactéries *Tenacibaculum maritimum* (souche TFA4) issues d'une culture en milieu liquide (Marine Broth de DIFCO) après une coloration de May Grünwald Giemsa (image réalisée au laboratoire)

Régulièrement, une autopsie est réalisée afin d'identifier les lésions présentes sur les organes internes des poissons échantillonnés. Les lésions observées peuvent présenter des différences selon l'espèce hôte et l'âge du poisson infecté ou en fonction de la souche de *Tenacibaculum* impliquée et son origine géographique. Au début de l'examen nécropsique, une attention particulière est portée à l'état général de l'animal, soit le stade de croissance, l'indice de condition corporel, l'aspect du tégument et des muqueuses. Les lésions externes et les cavités biologiques (buccale et branchiales) sont observées avant l'exploration de la cavité péritonéale et des autres organes internes comme le cerveau (Figure 13).

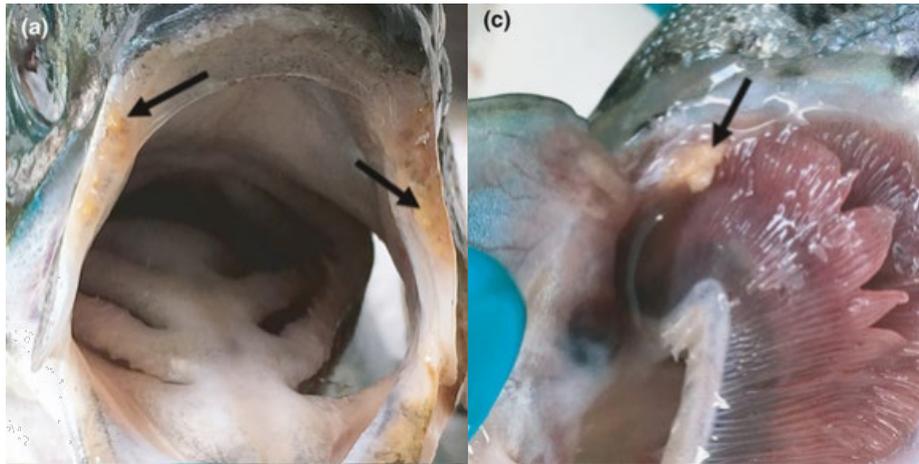


Figure 13 : Lésions de la cavité buccale et des branchies (syndrome de la bouche érodée) lors d'une infection par *Tenacibaculum maritimum* sur des saumons d'Atlantique au Canada (Frisch et al. 2018a)
Lésions jaunâtres de la cavité buccale (a) et des branchies (c) sur des poissons d'élevage.

En cas de ténacibaculose, les organes internes présentent généralement un aspect pâle, décoloré et on retrouve une accumulation de liquide séro-hémorragique dans la cavité péritonéale (Figure 14). On peut parfois déceler également la présence de pétéchies et de lésions hémorragiques sur le péritoine des animaux, ou encore une congestion des méninges et des anses intestinales (Avendaño-Herrera 2005). Les organes présentant des anomalies sont prélevés partiellement ou dans leur totalité pour effectuer des analyses de laboratoire diverses. Certaines lésions peuvent également être dues à des co-infections avec d'autres agents pathogènes ou un phénomène de dysbiose.



Figure 14 : Lésions cutanées et aspect des organes internes d'un platax orbicularis atteint de ténacibaculose en condition d'infection expérimentale. Pâleur des organes internes et liquide séreux dans la cavité péritonéale (image réalisée au laboratoire)

Les agents pathogènes de la ténacibaculose ont été identifiés depuis des échantillons de téguments mais aussi sur de nombreux organes internes de poissons. A titre d'exemple, la méthode de l'immunohistochimie a permis de repérer *Tenacibaculum maritimum* au sein des tissus de rein, rate, foie, cœur, tube digestif et branchie lorsque la bactérie est inoculée à forte concentration (10^9 UFC/poisson) par injection intrapéritonéale sur des turbots (*Psetta maxima*). Plus régulièrement, lors d'infection par balnéation, seule une très faible proportion des échantillons d'organes internes donne un résultat positif pour l'agent de ténacibaculose. Il s'agit d'un mode de contamination aboutissant à une symptomatologie plus fidèle à un cas d'infection naturelle. Autrement, l'étude d'Abdelaziz a isolé en culture bactérienne *T. maritimum* à partir de quelques prélèvements de foie et de rate (abdelaziz Abdelgalil, Hashem 2012), tandis que l'étude de Lopez a identifié ce même agent infectieux par PCR quantitative sur de rares échantillons intestinaux (7/50) et un unique prélèvement de foie (1/50) de *Platax orbicularis* (Lopez et al. 2021).

- L'observation de lames histologiques

La réalisation de coupes histologiques permet une observation des lésions tissulaires à l'échelle microscopique. Pour certaines maladies, cela peut parfois mettre en évidence des lésions pathognomoniques ou directement la présence de l'agent pathogène par observation directe ou à l'aide de méthodes de marquages immunologiques comme en immunohistochimie (Faílde et al. 2013 ; 2014).

L'observation de lames histologiques de tégument de *platax orbicularis* révèle la présence de bactéries filamenteuses *Tenacibaculum-like* et de cellules inflammatoires au niveau de l'épiderme et du derme, à proximité des lésions de nécrose (Figure 15).

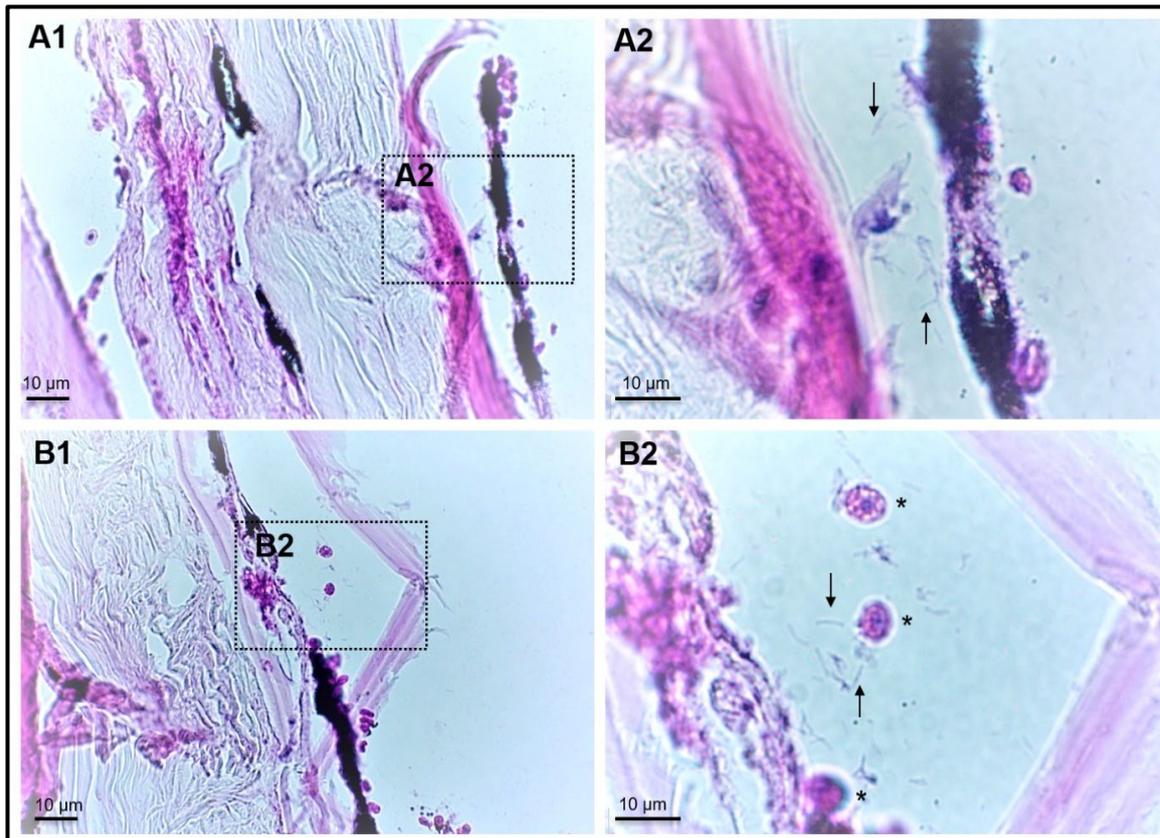


Figure 15 : Deux coupes histologique transversales de tégument d’alevins de *Platax orbicularis* souffrant de ténacibaculose (d’après Lopez et al. 2021). A1 et B1 : lésions de nécrose affectant l’épiderme et le derme avec invasion de cellules *Tenacibaculum* (→), observables à plus fort grossissement (A2 et B2), et recrutement de cellules inflammatoires (*).

Il est également possible de repérer des lésions à l’échelle microscopique sur les organes internes des poissons. Elles sont marquées en histologie par des zones hémorragiques, le recrutement de cellules inflammatoires et des foyers de nécrose avec perte de matière. A la suite d’une infection expérimentale par injection intrapéritonéale de turbots (*Psetta maxima*), Faílde et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence des lésions similaires au niveau de la rate, du pancréas, du rein, du foie et du tube digestif (Faílde et al. 2013) (Figure 16).

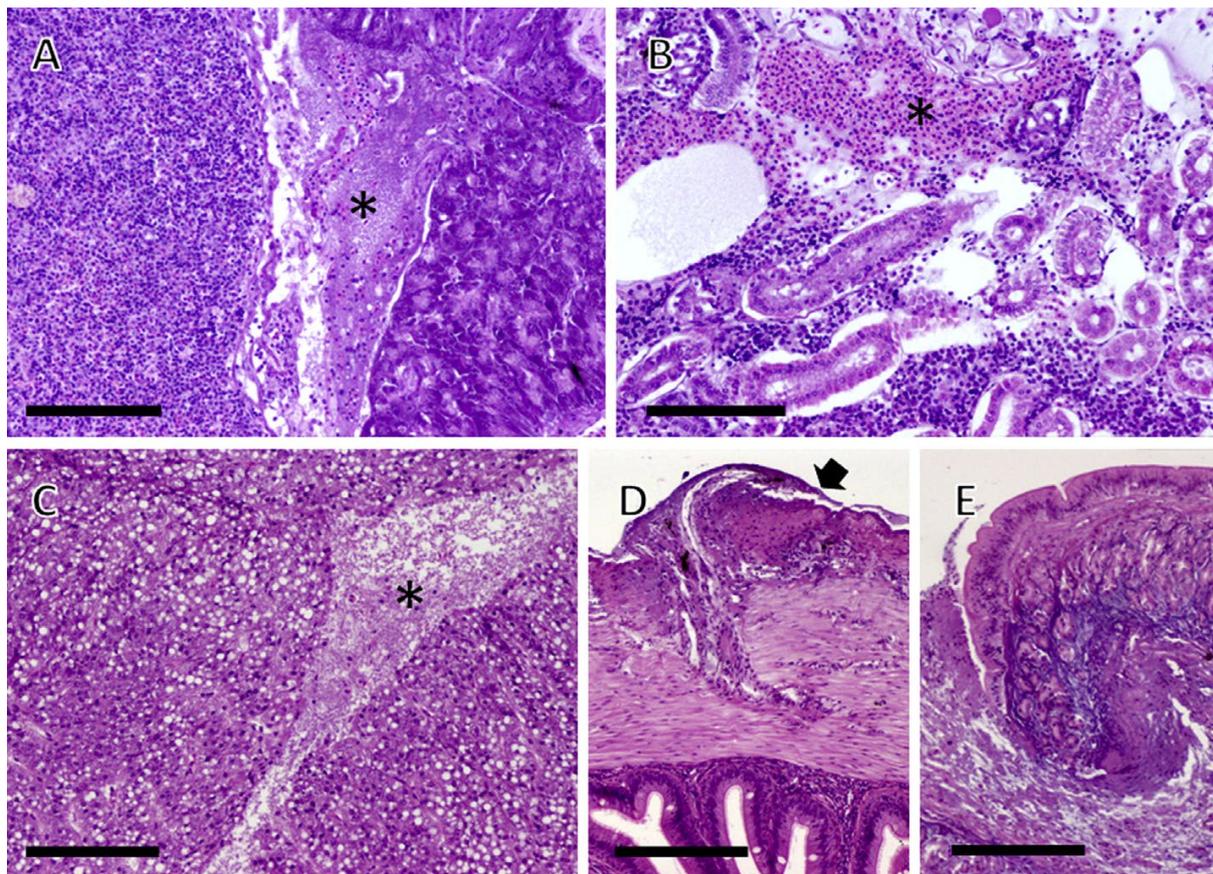


Figure 16 : Coupes histologiques d'organes internes de turbots (*Psetta maxima*) au cours d'une infection expérimentale par inoculation d'une suspension bactérienne de *T. maritimum* par injection intrapéritonéale (Faïlde et al. 2013). A. Zone de nécrose dans la séreuse de la rate (astérisque) et extension de la lésion au pancréas, échelle 100µm. B. Lésion hémorragique, zone de nécrose (astérisque) et atrophie du tissu hématopoïétique du rein, échelle 1000µm. C. Zone de nécrose dans le parenchyme du foie, échelle 100µm. D. Inflammation et nécrose (flèche) d'une coupe de tube digestif depuis la séreuse jusqu'à la couche musculieuse, échelle 200µm. E. Coupe d'estomac avec perte de l'épithélium et présence d'une légère réaction inflammatoire, échelle 200µm.

c) Les diagnostics de laboratoire

Les symptômes et lésions de ténacibaculose n'étant pas pathognomoniques, il est indispensable de procéder à des analyses de laboratoire afin d'obtenir un diagnostic de certitude. L'identification des bactéries du genre *Tenacibaculum* est possible par diverses techniques génétiques et non génétiques. Les méthodes non génétiques relèvent du domaine de la microbiologie, de la sérologie et de l'acquisition de certains profils spécifiques (MALDI-TOF). Les analyses génétiques regroupent le séquençage de l'ADN ribosomique 16S ou plus rarement du génome complet de la bactérie ainsi que diverses analyses PCR ciblant des fractions spécifiques de l'espèce au sein de gènes conservés chez les bactéries. De plus, il est possible d'atteindre différents niveaux d'identification des bactéries : genres, espèces, sous-espèces, clones, sous-clones voire plus précisément de les distinguer selon des types ou sous-types. Selon la méthode utilisée on peut distinguer des biotypes (morphologie et

physiologie), sérotypes (antigènes de surface), lysotype (sensibilité aux bactériophages), bactérinotypes (production ou sensibilité aux bactériocines) ou des types selon des profils protéiques (électrophorèse de protéines produites). Le degré de précision recherché diffère selon s'il s'agit d'une démarche diagnostique ou épidémiologique voire phylogénétique (Sauget 2017).

- La culture bactérienne, l'isolement et la caractérisation phénotypique, biochimique et métabolique

L'isolement des agents de la ténacibaculose est possible sur milieu sélectif (complémenté en antibiotiques) et non sélectif. Il est possible d'enrichir les colonies isolées voire les prélèvements par une culture en milieu liquide également. Ces milieux contiennent des nutriments et sont préparés à partir d'eau de mer naturelle ou artificielle.

Les caractères morphologiques de la bactérie *T. maritimum* et des colonies formées en culture ont été décrits par Wakabayashi et ses collaborateurs en 1984. Sur gélose cytophaga agar (Anacker, Ordal 1959), les colonies sont plates, fines et jaune pâle avec des bords irréguliers tandis qu'en milieu liquide, elles forment une pellicule à la surface et des agrégats sont parfois observés. L'aspect des colonies varie selon le milieu de culture utilisé. *Tenacibaculum maritimum* se développe entre 15°C et 34°C avec un optimum à 30°C (Wakabayashi, Hikida 1984) et sa culture nécessite 2 à 4 jours (Avendaño-Herrera 2005). Les milieux utilisés pour cette étude, le cytophaga agar et cytophaga broth (contenant un mélange de tryptone DIFCO, de levures et de polysorbate 80) furent les premiers milieux décrits par Anacker et Ordal en 1959. Depuis, divers milieux de culture (marine agar, *flexibacter maritimus* medium, selective *flexibacter* medium) ont été utilisés pour cultiver *T. maritimum* (Pazos et al. 1996) (Figure 17). Des milieux sélectifs, complémentés en antibiotiques comme la néomycine, la polymyxine B ou la kanamycine, sont parfois préférés pour la culture ou l'isolement de ce microorganisme (Chen et al. 1995 ; Pazos et al. 1996 ; Frisch et al. 2017). Pour l'étude de ses caractéristiques, des milieux plus spécifiques ont été décrits (Avendaño-Herrera 2005).

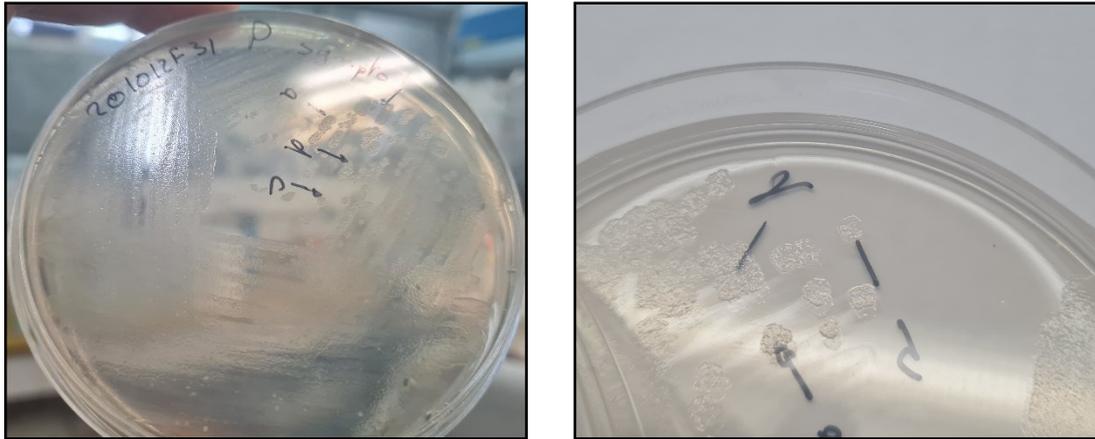


Figure 17 : Aspect morphologique typique de colonies *Tenacibaculum maritimum* cultivées sur milieu sélectif Marine Agar 2216 (Difco TM) (image réalisée en laboratoire)

L'aspect morphologique des colonies bactériennes en culture ne permet pas à lui seul une identification directe du pathogène. Une caractérisation phénotypique, moléculaire, protéomique, biochimique ou métabolique est nécessaire.

Les méthodes phénotypiques se fondent sur l'identification des caractéristiques biochimiques et physiologiques de la bactérie ainsi que sur sa sensibilité aux antibiotiques. Les systèmes commerciaux de recherche d'activité enzymatique API® ZYM et de tests biochimiques API 50 ont facilité l'identification des bactéries même si les méthodes traditionnelles de microbiologie restent très utilisées. Les espèces pathogènes du genre *Tenacibaculum* présentent une certaine homogénéité morphologique, phénotypique et biochimique ce qui facilite le diagnostic de ténacibaculose (Fernández-Álvarez, Santos 2018 ; Avendaño-Herrera et al. 2016 ; 2006b ; Olsen et al. 2017 ; Småge et al. 2016 ; Toranzo et al. 2005). La sensibilité aux antibiotiques diffère selon l'espèce de *Tenacibaculum* considérée et les antimicrobiens évalués. Les antibiogrammes réalisés sur différentes souches de l'espèce *T. maritimum* révèlent une sensibilité commune à l'amoxicilline, au florfenicol, à l'oxytétracycline et aux sulfamides potentialisés* (Avendaño-Herrera, Irgang, et al. 2005 ; Avendaño-Herrera et al. 2008). La caractérisation de la bactérie peut également être faite par l'analyse de sa constitution en certaines molécules d'intérêt. On retrouve régulièrement des analyses de profils protéiques (Bernardet et al. 1994 ; Avendaño-Herrera et al. 2004a ; van Gelderen et al. 2010), de profils d'acides gras (M. Piñeiro-Vidal et al. 2008) ou de profils de lipopolysaccharides (LPS) (van Gelderen 2007).

Les méthodes conventionnelles comme la culture bactériologique nécessitent souvent plusieurs jours. Or *Tenacibaculum maritimum* est une bactérie mésophile à croissance relativement lente ce qui rend possible la contamination des lésions et des prélèvements par

*Les sulfamides potentialisés résultent de l'association d'un sulfamide et d'une 2,4 diaminopyrimidine.

d'autres micro-organismes, comme ceux du genre *Vibrio* souvent retrouvés en co-infection, ce qui complique son diagnostic (Pazos et al. 1996). Dans ce contexte, les méthodes de diagnostic génétiques, sérologiques, protéomiques et chimiotaxonomiques présentent un intérêt majeur pour une identification rapide de ce pathogène en minimisant le risque d'obtenir un faux négatif ou de faire une erreur sur l'agent étiologique.

- Les analyses sérologiques

Les méthodes sérologiques sont un outil diagnostique parmi les plus utilisés. En plus de cela, elles sont essentielles dans le cadre de l'élaboration d'un vaccin afin de réaliser un typage sérologique et ainsi sélectionner les souches d'intérêt. Il existe différentes techniques pour évaluer si une souche bactérienne appartient ou non au même sérotype que les souches de référence à partir desquelles des anticorps ont été obtenus.

Pour la caractérisation sérologique de *T. maritimum*, les méthodes conventionnelles ayant été utilisées sont les techniques d'agglutination (Wakabayashi, Hikida 1984 ; Baxa et al. 1988 ; Ostland et al. 1999), d'immunodiffusion (Baxa et al. 1988 ; Ostland et al. 1999), le Dot blot assay (Avendaño-Herrera et al. 2004a) et le Western blot (Ostland et al. 1999 ; Avendaño-Herrera et al. 2004a). Les plus utilisées pour une démarche d'identification de *T. maritimum* sont les méthodes d'agglutination sur lame et de microagglutination cependant elles présentent une faible sensibilité (Fernández-Álvarez, Santos 2018) et de plus ces souches bactériennes sont sujettes à former des auto-agglutinations (Avendaño-Herrera et al. 2006b ; Piñeiro-Vidal 2008). Les méthodes de Dot blot assay présentent une alternative rapide et peu coûteuse pour le diagnostic de la ténacibaculose et le typage des souches de plusieurs des espèces pathogènes de *Tenacibaculum*. Par ailleurs des techniques d'immunohistochimie (Faílde et al. 2014) et d'immunofluorescence indirecte (Yardimci, Timur 2016) ont été développées qui permettent de localiser la bactérie dans les tissus et d'en apprendre ainsi davantage sur sa pathogénicité. Cependant elles ne sont pas utilisées en routine et cette dernière technique peut présenter des résultats variables selon la souche de *T. maritimum* analysée (Powell et al. 2004).

Les analyses sérologiques citées sont donc non seulement utilisées pour identifier l'agent *T. maritimum* mais aussi pour connaître le sérotype auquel appartient la souche impliquée. En effet, la communauté scientifique a tout d'abord pensé que les souches de *T. maritimum* formaient un taxon homogène d'un point de vue sérologique (Bernardet, Grimont 1989 ; Bernardet et al. 1990). Or à ce jour, quatre sérotypes ont été identifiés à partir des

isolats européens et asiatiques (Avendaño-Herrera et al. 2004a ; Castro et al. 2007 ; Bridel et al. 2020). S'agissant d'une hétérogénéité portée par la variabilité de l'antigène O des lipopolysaccharides, ils sont désignés comme les sérotypes O1, O2, O3 et O4. Bien que cette variabilité sérologique fût tout d'abord décrite comme associée à l'espèce hôte, des études ont par la suite démontré la présence de différents sérotypes chez la même espèce. En effet, l'identification du sérotype O3 par l'équipe d'Avendaño-Herrera en 2005 sur des isolats provenant de soles d'élevage a contredit cette théorie car le sérotype O1 avait été identifié majoritairement chez cette même espèce de poisson (Avendaño-Herrera, Magarinos, et al. 2005). Par la suite, des souches de *T. maritimum* de sérotype O3 ont été identifiées comme responsables de phénomènes de mortalité dans des lots de turbots, l'espèce hôte à partir de laquelle le sérotype O2 avait été mis en évidence (Castro et al. 2007). Le sérotype O4 quant à lui a été identifié en Espagne. Il y est rarement retrouvé et il n'a jamais été observé ailleurs dans le monde (Piñeiro-Vidal et al. 2007).

- Les analyses génétiques et moléculaires

Les analyses génétiques sont utilisées dans de nombreuses études pour identifier un agent pathogène car elles permettent un diagnostic souvent plus rapide que les méthodes conventionnelles. De plus, certaines techniques présentent l'avantage de pouvoir être réalisées à partir de colonies bactériennes isolées mais aussi directement depuis les tissus et prélèvements échantillonnés. On peut distinguer les méthodes de séquençage ADN, d'hybridation ADN ou encore les profils de bandes ADN. Nombre de ces techniques reposent sur une réaction de polymérase en chaîne (PCR), ciblant une région spécifique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et une révélation par un marqueur fluorescent.

Différents protocoles ont été développés pour identifier les agents pathogènes de la ténacibaculose dont beaucoup ciblent l'espèce *Tenacibaculum maritimum*. En 1990, l'équipe de Woese a obtenu pour cette espèce le séquençage complet de la région de l'ADN qui code pour l'acide ribonucléique (ARN) de la sous unité ribosomique 16S (Woese et al. 1990). Il s'agit de la région d'ADN la plus utilisée par la communauté scientifique pour les études phylogénétiques et l'identification des bactéries. Ces données génétiques sont disponibles en ligne, par exemple dans la base de données GenBank, et permettent à de nombreuses équipes scientifiques de développer de nouvelles méthodes moléculaires encore aujourd'hui. La première PCR ciblant une région du 16S de *T. maritimum* a été développée par Tomaya et ses collaborateurs en 1996 (Toyama et al. 1996). Depuis 2017, le séquençage du génome complet de *T. maritimum* a été obtenu par l'équipe de Pérez-Pascual (Pérez-Pascual et al. 2017). A la

même période, les génomes complets des espèces pathogènes *T. ovolyticum* (Teramoto et al. 2016), *T. dicentrarchi* (Grothusen et al. 2016) et *T. soleae* (Lujan et al. 2016) ont également été séquencés.

Différentes techniques de PCR ont été développées pour détecter des régions ciblées de l'ADN de *Tenacibaculum maritimum*. On distingue la PCR conventionnelle, qui consiste en une étape d'amplification de séquences cibles dont la taille est révélée sur gel d'agarose (Toyama et al. 1996 ; Bader, Shotts 1998), la PCR emboîtée (ou *nested* PCR) qui permet d'améliorer la spécificité de la réaction grâce à un second couple d'amorce encadrant une région contenue dans la séquence ciblée par le premier couple (Cepeda et al. 2003 ; Avendaño-Herrera et al. 2004b), et la PCR quantitative qui repose sur une révélation en temps réel, à chaque cycle d'amplification, de façon à déduire la quantité initiale du fragment d'ADN ciblé dans l'échantillon (Fringuelli et al. 2012 ; Fernández-Álvarez et al. 2019). Par ailleurs, il existe des réactions permettant de révéler uniquement les cellules procaryotes ciblées qui sont vivantes. En effet, il s'agit des méthodes de rétrotranscription-polymérase en chaîne (RT-PCR) qui comportent une première étape de conversion de l'ARN des cellules en ADN par l'enzyme de transcriptase inverse (Wilson, Carson 2003). De plus, une méthode PCR de viabilité (v-PCR) a été mise au point par Brosnahan et ses collaborateurs en 2019 qui permet de ne détecter que les cellules vivantes de *T.maritimum* (Brosnahan et al. 2019). D'autres techniques complexes impliquant des réactions PCR ont été développées à partir du génome de *Tenacibaculum maritimum* comme les méthodes de puces à ADN utilisant la technologie microarray (Warsen et al. 2004) et de PCR-ELISA couplant analyses génétiques et sérologiques (Wilson et al. 2002).

Les analyses génétiques sont également utilisées pour réaliser un typage des souches d'une même espèce bactérienne, le plus souvent en recherchant des correspondances sérologiques. À propos de *T. maritimum*, l'équipe d'Avendaño-Herrera a confirmé l'existence d'une diversité génétique au sein de l'espèce en 2004. Pour cela, ils ont mis au point une technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphique par PCR (ou RAPD-PCR) (Avendaño-Herrera et al. 2004c). Les résultats obtenus ont permis d'obtenir deux sous-catégories, suivant une tendance relativement cohérente avec les deux sérotypes de l'antigène O déjà identifiés pour cette espèce. Des distinctions ont aussi été constatées entre les souches isolées de mêmes espèces hôtes, ce qui présente un fort intérêt dans le cadre d'une enquête épidémiologique. Par cette méthode, la distinction de *T. maritimum* vis-à-vis des espèces pathogènes *T. gallaicum*, *T. discolor* et *T. soleae* est avérée, en revanche elle n'a pas été

démontrée vis-à-vis des autres espèces du genre. L'analyse de séquences multi-loci (*MultiLocus Sequence Analysis* ou MLSA) permet de distinguer différentes espèces pathogènes de *Tenacibaculum* et de différencier plusieurs génotypes. De plus, elle permet d'opérer des rapprochements entre des souches isolées géographiquement. C'est un outil d'intérêt dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques (Habib et al. 2014 ; Frisch et al. 2017 ; Avendaño-Herrera et al. 2016).

- D'autres analyses non génétiques : protéomiques et chimiotaxonomiques

De plus en plus, la recherche scientifique s'oriente vers la mise au point de méthodes diagnostiques ou de typage qui soient rapides et peu coûteuses. Dans cette démarche, on trouve la technologie MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight – Mass Spectrometry*) qui repose sur la recherche de signaux spécifiques pour des spectres renseignant le « temps de vol » après ionisation et vaporisation des protéines. Elle concerne toutes les protéines bactériennes d'une taille de 2000 à 20 000 Dalton (Da), à savoir les protéines de ménage, ribosomiques comme structurales. S'agissant d'une méthode comparative, elle nécessite de posséder une importante base de données pour constituer des spectres de références et repérer des spécificités. Huit pics spécifiques au genre *Tenacibaculum* ont été identifiés par Fernández-Álvarez et ses collaborateurs en 2017 à partir des espèces *T. maritimum*, *T. soleae*, *T. dicentrarchi*, *T. ovolyticum*, *T. discolor* et *T. gallaicum* (Fernández-Álvarez et al. 2017). Certains pics ont également été repérés comme marqueurs spécifiques de quelques unes de ces espèces. L'obtention de spectres de référence pour chaque sérotype est difficilement envisageable étant donné que cette méthode est essentiellement fondée sur l'analyse des protéines ribosomiques de part leur abondance et leur poids moléculaire, qui ne portent pas de marqueurs de la spécificité sérotypique, et que de plus le nombre d'isolats disponibles est trop faible pour les sérotypes O2, O3 et O4. L'analyse en grappes et en composantes principales ou PCA (*principal component analysis*) des données de masse sont des outils similaires de taxonomie, fondés sur l'étude des profils protéiques. L'utilisation du MALDI-TOF comme outil d'identification pour les bactéries pathogènes du genre *Tenacibaculum* a également fait l'objet d'une thèse CIFFRE (Bridel 2020). Ce travail de thèse a abouti à la création d'un logiciel en ligne (<http://genome.jouy.inra.fr/shiny/maldiquanttyper/>) permettant d'identifier, sur la base de l'ensemble des données spectrales, si un isolat appartient à une espèce du genre *Tenacibaculum* pathogène voire à une espèce réputée non pathogène. L'outil est fondé sur la recherche de pics spécifiques, résultant d'un polymorphisme espèce spécifique, ayant pour

origine des séquences d'ADN codant pour des protéines ribosomiques et de biomarqueurs intraspécifiques. En chimiotaxonomie, certaines espèces de *Tenacibaculum* ont pu être caractérisées en fonction de leur teneur en esters méthyliques d'acides gras qui servent de marqueurs biochimiques (Piñeiro-Vidal 2008).

De nombreuses méthodes phénotypiques et moléculaires sont employées pour identifier et caractériser une infection de ténacibaculose. La démarche diagnostique repose sur un diagnostic clinique associé à plusieurs analyses de laboratoire mettant en jeux des cultures bactériennes puis une identification et une caractérisation de l'agent pathogène (ou des agents pathogènes) par des analyses sérologiques ou moléculaires voire protéomiques.

4. Des méthodes de lutte contre la ténacibaculose

a) Prophylaxie et zootechnie :

Dans la littérature scientifique les infections de ténacibaculose sont régulièrement associées à certains facteurs de risque comme de mauvaises conditions environnementales (forte densité de population, milieu pauvre en nourriture, augmentation de la température et de la salinité, faible qualité de l'eau, période de fort ensoleillement), l'induction de stress chez les animaux ou encore des lésions cutanées engendrées par une mauvaise zootechnie ou manutention (Handlinger et al. 1997 ; Campbell, Buswell 1982 ; Wakabayashi et al. 1986 ; McVicar, White 1982). Une bonne maîtrise des cycles de production et des aspects zootechniques et zoosanitaires est primordiale pour minimiser le risque de déclenchement d'un épisode de ténacibaculose. Malgré tout, la maladie peut survenir en l'absence de ces facteurs de risque.

La prophylaxie sanitaire rassemble l'ensemble des mesures permettant d'éviter l'introduction et la circulation de pathogènes dans les élevages, ainsi que celles assurant un confort physiologique aux animaux contribuant à minimiser les facteurs de risques de survenue des maladies. Ces mesures préventives regroupent le contrôle des paramètres environnementaux physicochimiques (température, salinité, turbidité, saturation en oxygène, pH), zootechniques (densité de population, ration alimentaire et mode de distribution, stockage de l'aliment, etc.) et sanitaires (protocole de quarantaine, contrôle du statut sanitaire des lots, pédiluve, protocole de désinfection des mains et du matériel, désinfection des locaux et vide sanitaire, maîtrise sanitaire de l'eau, traitements préventifs etc.).

Les méthodes prophylactiques contre la ténacibaculose pour la filière du *Paltax orbicularis* reposent sur les protocoles de désinfection du personnel et des locaux ainsi que

sur le suivi du statut sanitaire des animaux. Ils sont détaillés dans la partie I.3.d). La prophylaxie médicale concerne exclusivement les traitements par dessalure des lots de géniteurs tous les trois mois (la salinité est diminuée progressivement de 35 ‰ à 10 ‰ pendant 7 jours), ainsi que des nouveaux individus avant leur mise au contact des autres poissons d'élevage (David et al. 2008). En Polynésie française, aucune méthode d'immunoprophylaxie (vaccination et molécules immunostimulantes), dirigée contre la ténacibaculose ou tout autre maladie, n'est actuellement réalisée systématiquement au cours du cycle d'élevage. En effet un faible nombre de vaccins sont commercialisés en aquaculture et localement, très peu de maladies majeures ont été identifiées. Un vaccin commercial inactivé et adjuvé FM95 (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000), est disponible contre *Tenacibaculum maritimum* mais il présente une efficacité variable selon les lieux géographiques et les souches bactériennes qui y sont présentes. Par ailleurs, de nombreuses recherches sur des probiotiques et des molécules immunostimulantes ont été menées sans que des résultats suffisamment significatifs ne motivent leur intégration dans le cycle d'élevage.

Bien que les mesures préventives mises en place minimisent l'incidence de la maladie, majoritairement au cours de l'élevage larvaire et de l'alevinage, la recherche de traitements préventifs ou curatifs contre l'agent *T. maritimum* reste essentielle pour la filière.

b) Les traitements antibiotiques

A ce jour, seule l'utilisation d'antibiotiques est connue pour traiter efficacement la ténacibaculose. Au Canada, le triméthoprime-sulfadiazine (Romet 30) et le florfénicol (Aquaflor) sont disponibles sur le marché. Cependant l'utilisation de triméthoprime-sulfadiazine en pisciculture exige un délai d'attente de 500 degrés jours ce qui est incompatible avec la production piscicole (Nowlan et al. 2020). L'amoxicilline est une alternative très utilisée ayant un délai d'attente de 50 degrés jours, soit dix fois plus faible, mais il serait moins efficace. Autrement, l'oxytétracycline bien qu'efficace contre la ténacibaculose présente des effets négatifs pour une utilisation sur le long terme (Almeida et al. 2019 ; Kerry et al. 1996). De plus, des études ont démontré un phénomène d'antibiorésistance de souches de *T. maritimum* à certaines quinolones comme l'enrofloxacin et la flumequine (Avendaño-Herrera et al. 2008). L'utilisation systématique d'antibiotiques à visée prophylactique ou curative n'est pas souhaitable compte tenu des nombreux effets négatifs à long terme (Cabello 2006), c'est pourquoi des solutions durables, plus respectueuses des poissons d'élevage, du consommateur, des autres organismes marins et de l'environnement sont recherchées.

c) Des axes de recherche en sélection génétique et compléments alimentaires

Ainsi, plusieurs axes de recherche ont été étudiés dans le but d'améliorer la résistance des individus contre la ténacibaculose. Pour la filière du *Platax orbicularis*, certains sujets d'étude sont toujours en voie de développement. Ils s'articulent plus particulièrement autour de l'administration de molécules probiotiques ou immunostimulantes par voie orale et de l'identification de gène de résistance chez le platax.

La communauté scientifique a démontré que la poudre d'ail (*Alium sativum*) pouvait permettre d'augmenter le gain de poids des poissons tout en renforçant leur immunité. Ce complément alimentaire posséderait des propriétés antimicrobiennes également contre certains microorganismes, dont *Vibrio harveyi* (Talpur, Ikhwanuddin 2012) ou encore antiparasitaires notamment contre *Neobenedenia sp.* (Militz et al. 2013). De la même façon, en aquaculture, le curcuma (*Curcuma longa*) et le gingembre (*Zingiber officinalis*) possèdent des propriétés immunostimulantes, antibactériennes, antivirales et antifongiques notamment démontrées *in vivo* contre l'agent bactérien *Aeromonas hydrophila* (Sahu et al. 2008 ; Nya, Austin 2009).

En ce qui concerne les recherches menées localement sur la filière du *Platax orbicularis*, plusieurs plantes ou algues ont été analysées afin d'évaluer si elles pourraient posséder des propriétés immunostimulantes vis à vis de la ténacibaculose. L'étude de Reverter s'est intéressée à diverses plantes médicinales locales que sont l'ail (*Alium sativum*), le curcuma (*Curcuma longa*), le gingembre (*Zingiber officinalis*) et le noni (*Morinda taxifolia*) ainsi qu'à l'algue *Asparagopsis taxiformis* avec une administration par voie orale aux *Platax orbicularis*. Les poissons supplémentés avec l'algue *A. taxiformis* enrobant l'aliment ont montré un gain de poids significativement supérieur au groupe contrôle. L'analyse transcriptomique de deux gènes de l'immunité, celui du lysozyme g (Lys G) et du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) a révélé une activité significativement supérieure au niveau du rein ou de la rate des platax supplémentés avec chacun des aliments hormis le noni (*M. taxifolia*). Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus pour les poissons ayant ingéré l'algue *Asparagopsis taxiformis* pendant 3 semaines (Reverter et al. 2016). Néanmoins, si l'ingestion de cette algue induit une surexpression significative des gènes de l'immunité, l'acquisition d'un effet protecteur vis à vis de la maladie n'est pas avérée.

De plus, lors de l'infection d'un groupe d'individus, certains d'entre eux déclarent parfois la maladie dans une moindre mesure ou ne présentent pas de signes cliniques. La

communauté scientifique tente de comprendre l'origine de ce phénomène de résistance, retrouvé pour diverses maladies. Des analyses génomiques ont permis d'identifier des gènes susceptibles de participer à la résistance de ces individus. Dans le cadre de l'étude menée par Le Luyer au sein du centre Ifremer du Pacifique, l'activité de gènes de résistance chez le *Platax orbicularis* a été analysée au cours d'une infection expérimentale par *Tenacibaculum maritimum*. Une comparaison est faite entre l'activation des gènes de poissons non infectés (contrôles) et celle de poissons ayant survécu 96 heures après l'infection qui sont qualifiés de résistants. Les résultats montrent que les individus dits résistants sont capables de maintenir la structure et l'intégrité de la barrière tégumentaire et donc prévenir l'entrée des pathogènes. Cette observation est appuyée par l'expression différentielle des gènes codant pour des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (aussi appelés *Pattern Recognition Receptor* ou PRRs). Par ailleurs, une analyse comparative du polymorphisme génétique a été réalisée entre la population de poissons prélevés 24 heures après l'infection et celle des poissons résistants prélevés 96 heures post-infection. L'utilisation d'un panel de 13 448 marqueurs SNPs (polymorphisme nucléotidique sur une seule base) n'a pas permis de révéler l'existence de variants génétiques associés à la résistance à l'agent bactérien (Le Luyer et al. 2020). Des études complémentaires seraient nécessaires pour pouvoir sélectionner préférentiellement des reproducteurs porteurs de gènes de résistance.

5. Les connaissances autour de la vaccination des poissons

a) Le système immunitaire des téléostéens

▪ Les organes et cellules impliqués

Les cellules et mécanismes du système immunitaire des poissons, à l'instar des autres vertébrés, sont portés par les organes internes de la rate, du thymus, du rein, de la moelle épinière et du système circulatoire. De plus, le pronephros, ou rein antérieur, est un organe lymphoïde du poisson contenant des macrophages, granulocytes et lymphocytes B et T. Les particularités de l'immunité des poissons sont que des cellules immunitaires (macrophages) sont aussi identifiées dans l'atrium du cœur et que des cellules piliers des branchies sont dotées de la fonction de phagocytose. Les nœuds lymphatiques ne sont en revanche pas retrouvés chez les poissons. Les principaux types de cellules du système immunitaires des vertébrés sont présents chez les poissons tels que les lymphocytes B et T, les macrophages, les granulocytes et les thrombocytes. Des cellules cytotoxiques non spécifiques similaires aux

cellules « natural-killers » ainsi que des cellules analogues aux cellules dendritiques ont été identifiées (Boudinot, Dorson 2018).

La formule leucocytaire des poissons est dominée par la présence de lymphocytes à une proportion d'environ 85%. On retrouve également des cellules polynucléaires et des macrophages. Les macrophages ont une activité phagocytaire très importante. A la différence des autres vertébrés, les leucocytes polynucléaires des poissons n'ont qu'une très faible capacité à effectuer la phagocytose.

- La réponse immunitaire innée

Il existe deux types de réponse immunitaire : l'immunité innée, ou non spécifique, et l'immunité acquise, spécifique désignée également de réponse adaptative.

L'immunité innée constitue la première défense de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes. Ses effecteurs ont également le rôle clef de neutraliser et présenter les antigènes cibles dans le cadre de la mise en place de l'immunité spécifique. Les effecteurs de la réponse immunitaire non spécifique sont humoraux, cellulaires et tissulaires. Les cellules effectrices sont majoritairement les lymphocytes, les polynucléaires et les macrophages. Au même titre que chez les mammifères, des anticorps naturels dotés d'une spécificité relative sont identifiés dans le sérum des poissons.

Une particularité du poisson repose sur la production de mucus qui constitue une première barrière contre l'entrée des pathogènes. Il se compose de molécules actives comme la bactériolysine, le lysozyme, des facteurs du complément*, la protéine C-réactive, des peptides antibactériens et des immunoglobulines T (IgT) comparables aux immunoglobulines A (IgA), retrouvées chez les mammifères. Le mucus intestinal comporte des facteurs similaires au mucus cutané. Suite à une infection par des pathogènes, comme *Tenacibaculum maritimum* chez la sole sénégalaise, l'activité des effecteurs humoraux du mucus cutané se trouve modifiée (Guardiola et al. 2019). Par ailleurs des lymphocytes ont été retrouvés dans la peau de certaines espèces de poissons. Des molécules aux propriétés antivirales similaires aux interférons et cytokines (interleukines et chimiokines) des mammifères ont été retrouvées chez différentes espèces de téléostéens (Boudinot, Dorson 2018).

*le complément est un système de lyse et d'opsonisation des pathogènes ayant une activation déclenchée en cascade par des molécules de la paroi bactérienne pour la voie alterne ou par des anticorps pour la voie classique.

- La réponse immunitaire spécifique

La réponse immunitaire adaptative comporte une réponse humorale et une réponse à médiation cellulaire. Les anticorps des poissons présentent des particularités diverses. A titre d'exemple, les lymphocytes B synthétisent des immunoglobulines (Ig) tétramériques et non pentamériques comme ceux retrouvés chez les autres vertébrés. Il existe trois isotopes identifiés chez les poissons osseux : l'isotype IgM, l'IgD et l'IgT dont les fonctions restent peu connues à ce jour. L'IgT semble avoir une activité majeure dans la protection des muqueuses, notamment au niveau intestinal, comme l'IgA retrouvée chez l'Homme. Cette immunoglobuline aurait un rôle dans la réponse immunitaire systémique également. Des récepteurs spécifiques de l'antigène sont également exprimés à la surface des lymphocytes T (T cell receptor ou TCR) chez les poissons. Les gènes des chaînes β et α du TCR ont notamment été retrouvés chez la truite arc-en-ciel (Partula et al. 1995 ; 1996).

Des gènes très similaires à ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I et II) sont aussi retrouvés chez le poisson. Les peptides du CMH ont un rôle de présentation des antigènes aux lymphocytes T. Ces protéines présentent une variabilité considérable en fonction des individus, tant chez les mammifères que chez les poissons, ce qui peut expliquer les différences de sensibilité au sein d'une même espèce.

La réponse humorale des mammifères est caractérisée par la synthèse d'IgM suivie par celle d'IgG. Lors d'une nouvelle exposition à l'agent pathogène, le pic d'IgG observé est plus précoce et beaucoup plus important que lors de la première rencontre antigénique. Chez les poissons, lors de la deuxième exposition à un immunogène, la production d'anticorps spécifiques est également amplifiée et accélérée, bien que dans une moindre mesure que pour les vertébrés supérieurs. Cependant la synthèse d'une seconde classe d'anticorps n'est pas observée. La réponse est néanmoins spécifique et confère une bonne protection contre le pathogène reconnu. Le transfert de l'immunité est avéré lors de l'administration d'antigènes neutralisant spécifique (IgM) à des individus indemnes (Boudinot, Dorson 2018).

L'existence d'une réponse adaptative à médiation cellulaire chez les poissons a été suggérée par l'observation de rejets de greffes. Des cellules T cytotoxiques ont également été découvertes avec l'observation de lignées cellulaires ciblant spécifiquement des cellules autologues présentant l'antigène.

- Facteurs environnementaux et stades physiologiques liés à l'immunocompétence

Des facteurs environnementaux comme la température ont été identifiés comme ayant une influence majeure sur la cinétique et donc l'efficacité de la réponse immunitaire (Nikoskelainen et al. 2004). Une température basse induit un état d'immunodépression pouvant induire des pertes considérables comme chez le barbeau des rivières (*Ictalurus punctatus*) pour qui ce phénomène a été très étudié (Clem et al. 1984 ; Bly et al. 1988 ; Bly, William Clem 1991). Le stade physiologique, le sexe de l'animal ou encore la photopériode sont aussi des facteurs suggérés comme pouvant avoir une influence sur la réponse immunitaire.

L'estimation du stade à partir duquel le système immunitaire des poissons est immunocompétent présente un intérêt pour mettre en place des protocoles vaccinaux précoces sans prendre le risque de provoquer une tolérance* vis-à-vis du pathogène chez l'animal. Dès l'œuf chez les poissons, des anticorps et des protéines du complément ont été observés dans le vitellus. Un transfert de l'immunité spécifique à la descendance est également suggérée par une étude ayant observé une mortalité réduite chez les individus issus de truites vaccinées contre la nécrose hématoïétique infectieuse, bien que le caractère spécifique de cette protection transmise reste à démontrer (Oshima et al. 1996 ; Boudinot, Dorson 2018 ; Castro et al. 2015). L'étude de Johnson et ses collaborateurs sur les salmonidés vaccinés par bain contre *Vibrio anguillarum* et *Yersinia ruckeri* conclut qu'une immunité satisfaisante est obtenue dès le poids d'un gramme et pour une durée de 120 jours. Cette durée de protection augmente si la vaccination est faite plus tardivement (Johnson et al. 1982). Cependant, la vaccination est caractérisée par l'induction d'une mémoire spécifique et il reste important de démontrer que la protection immunitaire n'est pas conférée par des mécanismes de défense non spécifique lors de vaccination précoce.

*La tolérance immunitaire est la capacité du système immunitaire à ne pas induire de réaction en présence de certains antigènes. Physiologiquement un organisme est tolérant face à ses propres « auto-antigènes ».

b) La stratégie de la vaccination

▪ Les différentes formes de vaccins

Les connaissances acquises en immunologie chez les téléostéens ainsi que l'efficacité constatée des protocoles vaccinaux déjà mis en place contre des agents pathogènes divers, ont permis d'envisager l'élaboration d'un vaccin pour la ténacibaculose. Cependant pour choisir parmi les différentes formes vaccinales qui existent de nos jours, il est important de prendre en considération certaines caractéristiques de l'interaction du pathogène avec le système immunitaire de l'hôte.

On distingue tout d'abord les vaccins dits vivants à agents atténués qui sont les plus anciens vaccins. Ce sont des micro-organismes, majoritairement des virus, qui sont cultivés dans des conditions très favorables de façon à ce qu'ils perdent progressivement leur pouvoir pathogène. Ils induisent une réponse immunitaire humorale et cellulaire avec une protection de longue durée, ce qui permet d'élaborer des protocoles vaccinaux souvent en une seule injection. Les vaccins à agents inactivés quant à eux contiennent des pathogènes tués par un agent chimique permettant de conserver la structure des protéines antigéniques. Le formaldéhyde est le plus couramment utilisé, mais d'autres méthodes d'inactivation comme la sonication, le choc thermique ou l'utilisation d'autres produits chimiques sont aussi couramment utilisés. La réponse immunitaire induite est majoritairement humorale à mémoire courte et nécessite donc des injections de rappel. Les vaccins sous-unitaires sont composés uniquement de certains éléments de l'agent pathogène. Il peut s'agir d'exotoxines ayant perdu leur pouvoir pathogène ou de macromolécules purifiées porteuses de la spécificité antigénique lors de l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte. La durée de la protection immunitaire comme le type de réponse humorale seule (dite Th2) ou associée à une réponse cellulaire (dite Th1), sont alors très dépendantes de la nature des molécules administrées. Des formes vaccinales plus complexes sont étudiées, principalement pour une utilisation en médecine humaine dans un premier temps. Il s'agit de vaccins fondés sur un microorganisme dont les gènes de virulence ont été supprimés (vaccin vivant délété), mettant en jeu des antigènes de synthèse (vaccin synthétique) ou encore pour lesquels les gènes impliqués dans la synthèse d'antigènes spécifiques ont été intégrés dans un microorganisme vecteur. La durée de la protection immunitaire est difficilement prévisible et des études sont souvent nécessaires pour élaborer un protocole mentionnant le nombre et l'intervalle de temps nécessaire entre les

rappels de vaccination. Les rappels de vaccination peuvent être fait avec différentes formes antigéniques, ce qui peut améliorer la réponse immunitaire.

En fonction de la forme antigénique choisie, un adjuvant doit être ajouté à la préparation. Il n'est jamais incorporé dans le cadre d'un vaccin vivant atténué car l'antigène est déjà très immunogène. En effet, les adjuvants sont des immunostimulants ou des supports micro-particulaires qui jouent un rôle dans la biodisponibilité de l'antigène. Ils permettent d'amplifier la réaction inflammatoire ; la protection vaccinale apparaît plus précocement et la durée de l'immunité est plus longue. Il existe différents adjuvants (sels d'aluminium, saponines, carbomères, résines acryliques hydrosolubles, adjuvant de Freund*, etc.) qui peuvent orienter le système immunitaire de l'hôte vers une réponse humorale uniquement (dite Th2) ou également cellulaire (dite Th1). Dans le cadre d'une vaccination administrée par voie mucosale, l'incorporation d'un adjuvant amplifiant la réaction du système mucosal, permettant une stimulation accrue de la production d'IgA (ou d'IgT chez les poissons), serait idéale.

La voie d'administration d'un vaccin doit en effet être choisie avec soin car elle peut conditionner la réponse immunitaire qui sera stimulée. En aquaculture, une vaccination par balnéation voire parfois par voie orale peut déclencher majoritairement le système immunitaire mucosal, à défaut du système immunitaire systémique qui est quant à lui stimulé par les différentes formes d'injections (intradermique, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse). La réponse mucoale a pour objectif de bloquer l'agent pathogène dès l'infection tandis qu'une vaccination systémique permet de limiter sa diffusion et de minimiser ainsi l'apparition et la gravité des signes cliniques.

- La vaccination contre *T. maritimum*

La recherche d'une solution durable contre la ténacibaculose a conduit les scientifiques à s'intéresser à l'élaboration d'un vaccin pour les poissons d'élevage. Un vaccin à agent inactivé adjuvé FM 95, qui a été mis au point par l'université de Santiago, est commercialisé en Espagne pour une administration par injection aux turbots et salmonidés d'élevages (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000). Le protocole vaccinal consistait à l'origine en une balnéation des individus à un poids de 1 à 2 g, suivi d'un rappel de vaccination par injection à un poids de 20 à 30 g. La protection vaccinale était estimée à 50% par balnéation et augmentait jusqu'à plus de 85% avec une injection intrapéritonéale (Toranzo

*L'adjuvant de Freund est utilisé exclusivement dans le cadre de recherches scientifiques car il est très réactogène.

et al. 2005). Le mode d'administration actuellement conseillé consiste en une injection intrapéritonéale de 0.1 à 0.2 mL par poisson, selon le poids, ce qui a permis d'obtenir un taux de survie supérieur à 90% (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000). Des formulations de vaccins multivalents qui couplent une protection contre la tenacibaculose avec une couverture vaccinale contre la vibriose ou encore contre la streptococcose existent également pour le turbot (Toranzo et al. 2005). Néanmoins, bien qu'annoncé efficace contre des souches *T. maritimum* espagnoles pour les espèces ciblées (Romalde et al. 2005), le vaccin commercial FM95 semble connaître une certaine variabilité d'efficacité lorsqu'il est administré pour différentes espèces en Espagne comme à travers le monde. C'est pourquoi, Romalde et ses collaborateurs ont développé un autre vaccin espagnol adapté aux élevages de soles qui confère une protection permettant d'atteindre un taux de survie de 94% (Romalde et al. 2005). En Tasmanie, l'équipe de van Gelderen a mis au point un vaccin à partir d'une souche isolée localement qui présente des résultats très prometteurs (van Gelderen 2007). Il s'agit d'un vaccin pour les saumons d'Atlantique, administré par injection intrapéritonéale et contenant un adjuvant représentant 50% du volume final de la suspension vaccinale. Les pourcentages de survie obtenus avec cette suspension vaccinale sont d'environ 79%. Cependant, les vaccins développés localement ne sont généralement pas commercialisés car ils sont étudiés pour une espèce aquacole précise vis-à-vis de certaines souches.

Les différentes efficacités vaccinales peuvent s'expliquer par la variabilité antigénique de *T. maritimum* qui se subdivise en quatre sérotypes (Avendaño-Herrera et al. 2004a ; Toranzo et al. 2005), ce qui n'était pas pris en compte dans l'élaboration de ces vaccins. Il est intéressant de souligner que le vaccin commercial FM95 n'est élaboré qu'à partir d'antigènes provenant d'une souche de sérotype O2 qui a été isolée sur des turbots d'élevage. Autrement, d'autres essais vaccinaux se sont révélés infructueux comme ceux décrits par Frisch et ses collaborateurs avec la mise au point de trois suspensions vaccinales adjuvées à partir de 3 souches distinctes sans obtention d'une protection vaccinale efficace et ce malgré un taux d'anticorps significatif grâce à la vaccination (Frisch et al. 2018a). Pour finir, l'étude de Salati et collaborateurs de 2005 conclut, à partir d'observations de micro-agglutination et de mesures d'activité phagocytaire réalisées *in vitro* avec des anticorps provenant de sérums de poissons infectés, que les antigènes les plus prometteurs pour les essais vaccinaux seraient des extraits bruts de lipopolysaccharides par comparaison à deux autres modes de préparations vaccinales : cellules entières *T. maritimum* inactivées au formaldéhyde ou produits extracellulaires de *T. maritimum*, bien que ces derniers donnent tout de même des résultats

similaires à ceux obtenus avec les LPS s'agissant de l'activité phagocytaire (Salati et al. 2005).

.

SECONDE PARTIE :

LES TRAVAUX

EXPERIMENTAUX

CADRE DE L'ETUDE

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la thèse universitaire de Pierre Lopez portant sur l'épidémiologie des bactéries du genre *Tenacibaculum*, associées aux épisodes de mortalité du *Platax* d'élevage en Polynésie française. Cette étude a pour objectif d'étudier, plus particulièrement, les microorganismes présents lors d'une infection naturelle par la ténacibaculose en Polynésie française ainsi que d'identifier et de quantifier les différents sérotypes de *Tenacibaculum maritimum* impliqués dans l'infection de deux lots de *Platax orbicularis* de la filière piscicole locale. Ces recherches s'inscrivent dans l'objectif de conception d'un traitement curatif ou préventif respectueux de l'environnement, dont notamment la recherche d'un vaccin dirigé contre les souches de *T. maritimum* présentes localement.

Ces recherches ont été réalisées au sein du centre IFREMER du Pacifique en Polynésie française. Le centre travaille sur le développement d'une filière piscicole depuis 2001 et sur la maladie de la ténacibaculose depuis le premier incident de la « maladie des tâches blanches » observé en Polynésie française en 2009. Les échantillons utilisés au cours de cette étude ont été prélevés en amont de ce travail, au cours d'une campagne de prélèvements réalisée en 2020.

OBJECTIFS

L'objectif global de cette étude était d'identifier et de caractériser les agents pathogènes responsables des mortalités survenues dans deux sites d'élevage différents sur les *Platax orbicularis* issus d'un même lot. De par l'historique de cette filière piscicole en Polynésie française, où les épisodes de mortalité sont récurrents, la bactérie *Tenacibaculum maritimum* est fortement soupçonnée d'être à l'origine de ces mortalités. Néanmoins, des évènements de surinfection ou de co-infection, notamment avec la bactérie *Vibrio harveyi*, ont déjà été observés (Le Luyer et al. 2020).

Le premier objectif de cette étude consiste à identifier par métabarcoding tous les microorganismes présents sur le tégument d'un lot de *Platax orbicularis* au cours de ces deux épisodes de ténacibaculose. Ces analyses devraient nous permettre d'obtenir de précieuses informations sur les mécanismes et les organismes pathogènes impliqués dans ces mortalités. D'autre part, cette étude vise à déterminer s'il existe des différences significatives dans la

composition du microbiote tégumentaire des poissons selon la symptomatologie observée (platax symptomatiques et platax asymptomatiques) et selon le site d'élevage (ferme de Taha'a et de Toahotu). De plus, la composition en microorganismes de l'environnement proche des animaux, sur les structures d'élevage, a été analysée afin de déterminer si ces supports sont susceptibles de constituer un réservoir d'agents pathogènes.

Afin de confirmer les résultats obtenus par métabarcoding, la quantification par qPCR de l'agent *Vibrio harveyi*, déjà identifié au cours d'épisodes de ténacibaculose en Polynésie française (Le Luyer et al. 2020), devrait permettre d'étayer l'hypothèse d'une probable coinfection avec l'agent *Tenacibaculum maritimum*. Le second objectif de l'étude est donc de tenter de préciser le rôle de la bactérie *Vibrio harveyi* lorsqu'elle est retrouvée au cours de l'infection.

Le troisième objectif de mon projet de thèse a été de préciser l'incidence du ou des différents sérotypes de *T. maritimum* retrouvés au cours de ces deux épisodes de mortalité. Pour cela un outil de sérotypage moléculaire quantitatif a été développé dans le cadre ce travail. Cet outil repose sur l'utilisation de couples d'amorces spécifiques pour chacun des différents sérotypes décrit dans la littérature. Après avoir développé et optimisé les conditions d'amplification pour chacun des couples d'amorces sélectionnés, cette technique a été utilisée sur les échantillons d'ADN provenant des deux épisodes de ténacibaculose. Grâce à cette technique, nous avons pu déterminer et quantifier l'abondance des différents sérotypes présents. Ensuite, des essais de corrélation entre la quantité des différents sérotypes et la symptomatologie des poissons, leurs origines géographiques, ou encore leur charge en *T. maritimum* ont été réalisés.

Enfin, le dernier objectif de l'étude est de mettre en place et réaliser un premier test expérimental de protocole vaccinal, conçu contre des souches locales et répondant aux exigences de la filière de production du *Platax orbicularis*. Ce travail vise à déterminer, à partir des premières données expérimentales, si un vaccin inactivé adjuvé trivalent pourrait conférer une protection vis à vis des souches locales de trois sérotypes de *Tenacibaculum maritimum* impliqués dans des épisodes de ténacibaculose en Polynésie. Un protocole impliquant deux voies d'administration (baignation et injection intrapéritonéale), à deux stades de vie des poissons compatibles avec les enjeux de la filière y est organisé.

I. Travaux préliminaires : Le suivi zoosanitaire des *Platax orbicularis* issus d'un cycle de production en éclosion et élevés dans deux fermes de grossissement

Les analyses présentées dans cette étude ont été réalisées à partir d'une campagne d'échantillonnage ayant eu lieu d'août à novembre 2020. Cette dernière s'inscrit dans le projet « Ténacifight » mené par le centre IFREMER du Pacifique, la Direction des Ressources Marines et la CAPF (Coopérative des Aquaculteurs de Polynésie Française) et financé par la Délégation à la recherche de Polynésie française. Elle a été conduite par Déborah DELNESSE, une étudiante CREUFOP qui a réalisé un stage de 7 mois, dont le projet était de réaliser un suivi zootechnique, zoo sanitaire et environnemental d'un même lot de poissons dans deux fermes d'élevage différentes. Les modalités d'échantillonnage ainsi que les premières analyses effectuées sur ces prélèvements sont présentées succinctement dans ce premier paragraphe (I.) de la seconde partie de ce travail de thèse.

1. La campagne d'échantillonnage

▪ Suivi zoosanitaire et prélèvements

Les échantillons analysés proviennent du suivi d'un cycle de production (cycle 03-2020-03) de *Platax orbicularis* depuis la sortie de l'éclosion jusqu'à la fin de l'épisode symptomatique de l'infection naturelle de ténacibaculose. Les étapes de pré-grossissement des poissons, issus du même cycle de production en éclosion, ont été réalisées au sein de deux élevages aquacoles de Polynésie, à savoir la ferme Maranono située sur de l'île de Taha'a et l'élevage Tahiti Fish Aquaculture (TFA), situé dans la commune de Toahotu sur l'île de Tahiti. Une période de vide sanitaire, d'une durée d'un an pour la ferme de Taha'a et de 95 jours pour le site de Toahotu, a été respectée préalablement au transfert des alevins dans les élevages. La campagne d'échantillonnage et de suivi sanitaire a débuté le 27 septembre 2020 sur l'île de Taha'a et le 3 novembre 2020 sur le site de Toahotu et elle a duré 40 jours sur chaque site. Les alevins transférés à Taha'a le 28/09/20 avaient un poids moyen de 1,14g tandis que ceux, issus du même cycle larvaire, transférés à Toahotu le 04/11/20, avaient un poids moyen de 9,18g. Il est important de préciser que les poissons transférés sur le site de Toahotu ont été élevés durant la phase d'alevinage du 28 août jusqu'à leur transfert le 4 novembre (soit de 1g à 9g) sur le site de l'éclosion Vaia dans des conditions qui n'étaient plus biosécurisées (absence de filtration et de traitement de l'eau de mer aux rayons UV).

Deux échantillons ont été réalisés systématiquement pour chaque prélèvement : le premier pour être mis en culture bactériologique, dans l'objectif de réaliser une souche et d'analyser des isolats bactériens, et le second pour la réalisation d'analyses moléculaires à partir d'ADN extrait (PCR). Les échantillons utilisés pour les analyses bactériologiques ont été déposés en gaine de transport contenant un milieu sélectif marine agar enrichi en antibiotiques (le milieu de culture élaboré par le laboratoire LABOFARM de Loudéac est soumis à confidentialité) et ceux prélevés pour les analyses moléculaires ont été déposés immédiatement dans une solution de tampon de lyse (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%) contenant de la protéinase K à une concentration finale de 200 µg/mL (Brenner et al. 1982). Les prélèvements de mucus ont été réalisés par frottis, à l'aide d'un écouvillon stérile, en bordure des lésions pour les poissons dits symptomatiques (présentant des lésions caractéristiques de la ténacibaculose), et sur le flanc des platax dits asymptomatiques. Des échantillons d'eau de mer et de matériel biologique de bioencrassement (de l'anglais *biofouling*), déposé sur les structures d'élevage de type cordes et filets, ont également été collectés au cours des suivis d'élevage. Les prélèvements d'eau de mer correspondent à 300mL d'eau prélevée et filtrés à 0.22µm.

La campagne d'échantillonnage, réalisée au sein de chacun des deux sites, se décompose en trois étapes :

- L'évaluation du statut sanitaire des sites avant le transfert des platax dans les cages de grossissement des fermes (structures d'élevage et eau de mer).
- Les prélèvements réalisés tous les deux à trois jours au cours de l'épisode infectieux de ténacibaculose. Le transfert des animaux étant une grande source de stress, celui-ci est considéré comme à l'origine des mortalités survenant dans les 3 jours après la mise en cage des animaux.
- Un échantillonnage en fin d'épisode infectieux avec le prélèvement d'individus asymptomatiques, symptomatiques et des platax dits « guéris », présentant des lésions en voie de cicatrisation. Sur le site de Taha'a, tous les animaux ayant survécu à l'épisode infectieux étaient asymptomatiques à la fin de la campagne d'échantillonnage

- Présentation des échantillons

Un total de 135 échantillons a été collectés dans les fermes aquacoles dont 68 sur l'île de Taha'a et 67 à Toahotu. Parmi ces échantillons, 128 sont exploités dans le cadre de ce

travail de thèse car ils présentaient une quantité d'ADN extrait suffisant pour l'étude. Vingt-cinq échantillons supplémentaires ont été prélevés sur le site de l'écloserie Vaia. Ces prélèvements permettent d'établir le statut sanitaire du lot de platax pendant l'élevage larvaire, conduit en conditions biosécurisée avant le transfert sur l'île de Taha'a, ainsi que celui des platax élevés en conditions non-biosécurisées entre 1g et 9g avant leur transfert sur le site de Toahotu. Ainsi, un total de 153* échantillons ont été exploités pour lesquels les informations relatives aux prélèvements sont synthétisées par la figure 18 ci-après.

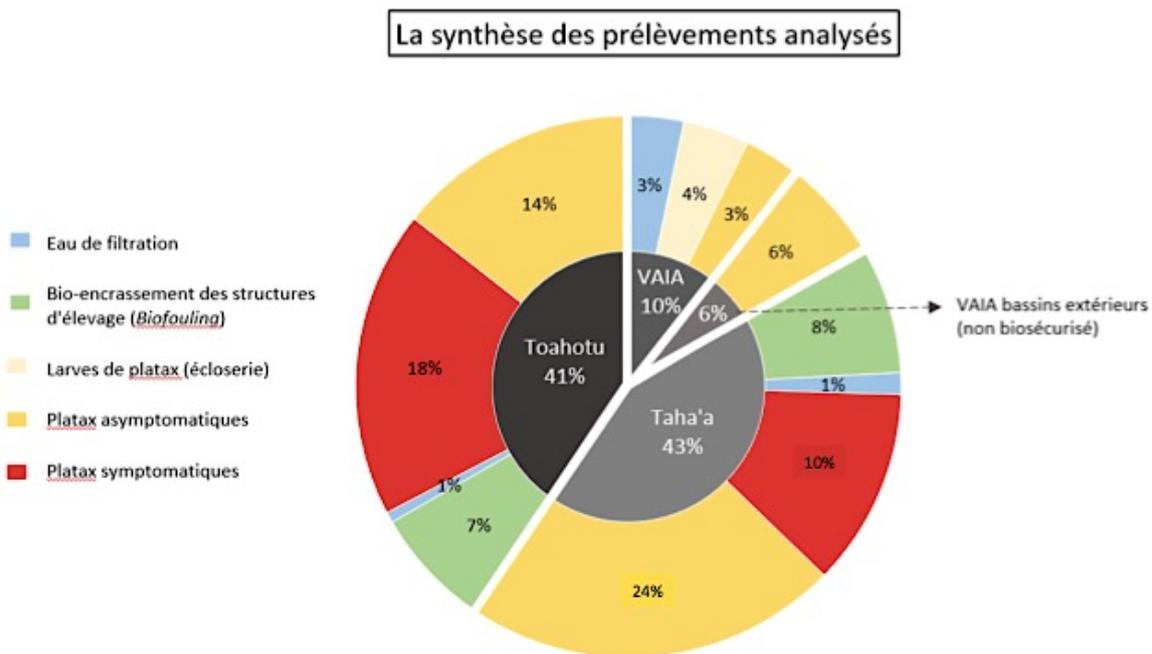


Figure 18 : Présentation synthétique des prélèvements analysés

Un suivi zootechnique des élevages (poids moyen, taux d'alimentation journalier, comportement alimentaire) et des paramètres environnementaux (température, salinité, oxygène dissout) a été réalisé en parallèle du suivi zoosanitaire, cependant ces données ne seront pas présentées dans ce travail.

Afin de faciliter la présentation des résultats des différents travaux, les échantillons exploités ont été renommés. Le nouveau nom comporte les informations essentielles relatives à la date de prélèvement, la nature de l'échantillon, le site d'échantillonnage ainsi que la numérotation du tube d'origine. La figure suivante (Figure 19) présente le code de cette nomenclature à partir d'un exemple.

*156 échantillons ont été récoltés dont 3 ne sont pas exploités dans ce travail. Les étapes d'amplification, de séquençage et de traitement bio-informatique ont été effectuées communément pour les 156 échantillons.

Exemple nom échantillon 1018_Pas_TA_58
Date de prélèvement 1018: le mois puis le jour
Nature de l'échantillon P: larve de platax Ps: platax symptomatique Pas: platax asymptomatique E: eau de filtration B: bio-encrassement des structures d'élevage (<i>biofouling</i>)
Site d'échantillonnage VA: Vaia (écloserie) TA: Taha'a TO: Toahotu
Numéro du tube d'origine 58: le numéro du tube

Figure 19 : Présentation de la nomenclature des échantillons à partir d'un exemple.

2. Les observations répertoriées au cours de ces suivis d'élevage

Au cours des suivis zoosanitaires, il a été constaté que des lésions étaient visibles sur le tégument des platax dès le jour du transfert en cages lagunaires, probablement des excoriations occasionnées lors du transfert (Tableau 5). Elles représentent probablement une porte d'entrée privilégiée pour les agents pathogènes, augmentant ainsi la cinétique de l'infection de ténacibaculose.

Tableau 5 : Synthèse des observations rapportées au cours des épisode symptomatiques de ténacibaculose dans les fermes aquacoles de Maranono (Taha'a) et TFA (Toahotu). Données non publiées issues du stage de D. Delnesse.

Jour post-transfert	Observations
J0	Excoriations tégumentaires sur les flancs dues au transport
J2	Premières mortalités dues au transfert (absence de symptômes et lésions de ténacibaculose)
J6	Extension des lésions tégumentaires à la tête, l'abdomen et la nageoire dorsale. Début des mortalités dues à la ténacibaculose.
J6-J17	Forte mortalité journalière. Pas d'arrêt de l'alimentation constaté sur le site de Taha'a.
J35	Tous les individus restant sont asymptomatiques sur le site de Taha'a

La cinétique de mortalité relevée au cours des cycles de grossissement en cages lagunaires est présentée dans les figures ci-dessous pour chaque site (Figures 20 et 21). La mortalité cumulée des lots de *Platax orbicularis* transférés à 1,14g dans la ferme de Taha'a est d'environ 76% tandis qu'elle est de 56% pour le site de Toahotu vers lequel les platax ont été transférés à un poids de 9,18g. Le pic de mortalité induit par l'infection a été défini, *a posteriori*, par une mortalité journalière supérieure à 2,5%. Il a été observé à compter du 4 octobre sur le site de Taha'a (soit 7 jours post transfert), où il dure 13 jours, et dès le 12 novembre (soit 8 jours post transfert) au sein de la ferme située à Toahotu mais pendant une plus courte durée, estimée à 6 jours.

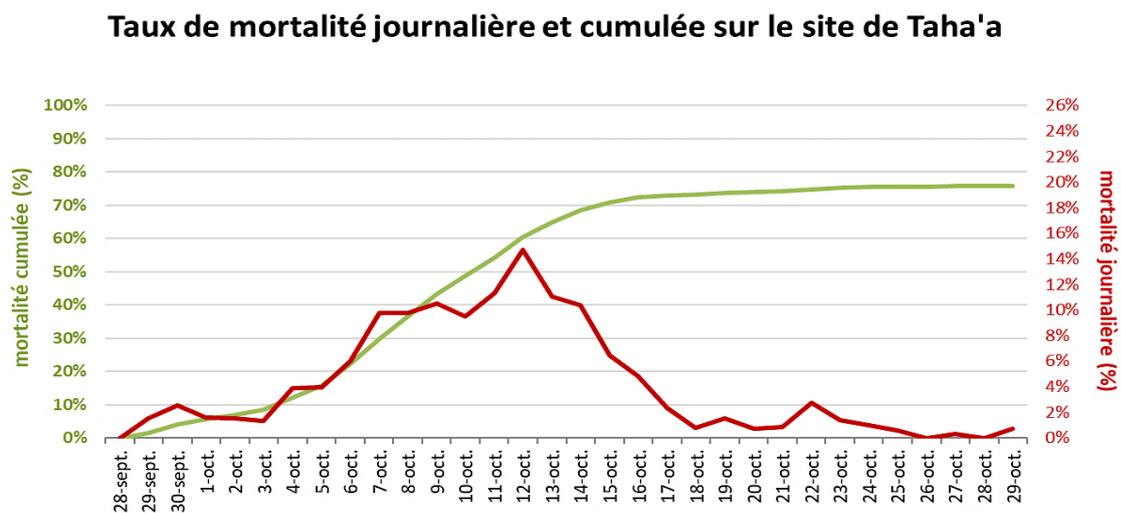


Figure 20 : Cinétique de mortalité d’alevins *Platax orbicularis*, observée au cours d’un épisode infectieux de ténacibaculose sur le site de Taha’a (Ferme Maranono). Données non publiées, D. DELNESSE.

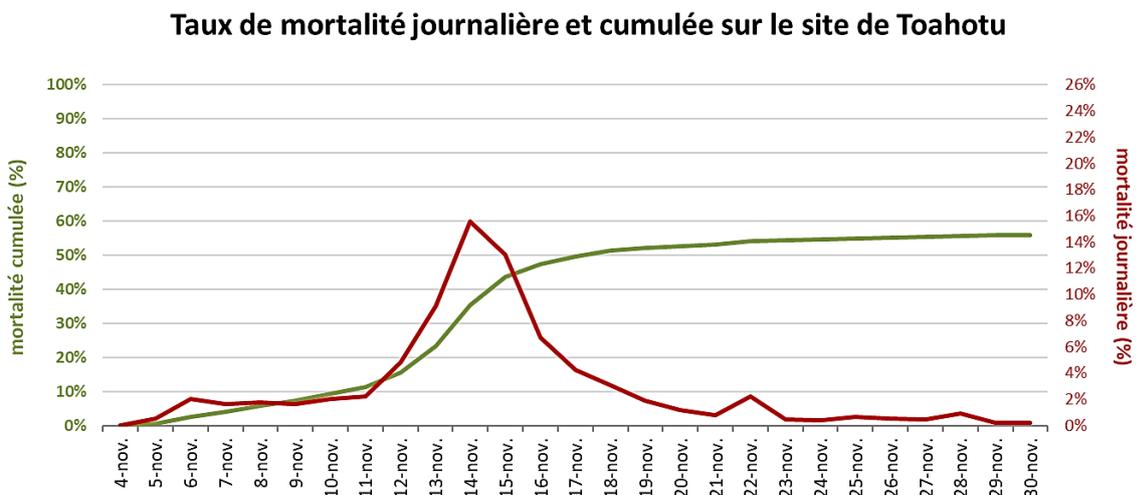


Figure 21 : Cinétique de mortalité d’alevins *Platax orbicularis*, observée au cours d’un épisode infectieux de ténacibaculose sur le site de Toahotu (Ferme Tahiti Fish Aquaculture). Données non publiées, D. DELNESSE.

3. Les analyses de laboratoire réalisées au préalable

Préalablement aux techniques d'analyse présentées dans les parties expérimentales de ce travail de thèse (aux paragraphes II à IV de cette seconde partie), plusieurs travaux ont été réalisés sur les mêmes échantillons. Un isolement bactérien a été réalisé sur milieu de culture sélectif, 3 à 4 isolats représentatifs de chaque boîte de Pétri a ainsi été mis en collection. Ils ont ensuite été testés par une méthode de diagnostic par PCR en temps réel spécifique de *T. maritimum*, développée par Pierre Lopez et collaborateurs (données non publiées, méthode détaillée dans cette seconde partie au paragraphe III.1), afin de déterminer quels isolats appartenaient à l'espèce *T. maritimum*. L'utilisation de cette technique de qPCR avait pour objectif de confirmer la présence de l'agent pathogène *T. maritimum*, la quantification d'un isolat bactérien étant un non-sens. Ensuite, les isolats bactériens obtenus et identifiés préalablement comme appartenant à *T. maritimum* ont été analysés à l'aide d'une PCR multiplex de sérotypage, en cours de développement par Pierre Lopez et collaborateurs (données non publiées), afin d'identifier à quels sérotypes de *T. maritimum* correspondent ces isolats. L'étape préalable d'isolement, indispensable pour utiliser la PCR multiplexe de sérotypage, ne permet de mettre en évidence que le sérotype majoritairement présent dans l'échantillon.

Dans le cadre des analyses moléculaires, l'ADN des 153 échantillons déposés en tampon de lyse a été extrait par une méthode classique utilisant un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (50 :48 :2). Ce protocole se déroule en quatre étapes à savoir la lyse cellulaire, l'élimination des protéines, lipides et carbohydrates et la concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol.

Pour chacun des ADN extrait des prélèvements, l'agent *T. maritimum* a été quantifié par deux méthodes distinctes de PCR quantitatives : la première décrite par Fringuelli en 2012 (Fringuelli et al. 2012) et la seconde qui est en cours de développement par Pierre Lopez et collaborateurs au sein du centre Ifremer du Pacifique (données non publiées, méthode décrite dans la seconde partie de ce document au paragraphe III.1). Il s'agit de la technique ayant été utilisée pour confirmer la détection de *T. maritimum* à partir des isolats bactériens. Cette méthode est complétée par la détection de la présence éventuelle d'inhibiteurs de la polymérase dans l'échantillon (méthode décrite en annexe 4).

Certains résultats des analyses de laboratoire de ce travail préliminaire sont présentés par la suite conjointement aux études menées dans ce travail de thèse.

II. Étude du microbiote tégumentaire d'un cycle de production de *Platax orbicularis* soumis à une infection naturelle de ténacibaculose dans deux fermes de grossissements

1. Matériel et méthodes

a) Extraction et séquençage de l'ADN bactérien

Après extraction de l'ADN, les 153 prélèvements ont été envoyés auprès de l'entreprise Genome Quebec pour séquençage avec la technologie Illumina MiSeq PE250. L'objectif était de cibler une partie du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (région variable V4) avec les amorces 515F et 806R (Tableau 6).

En parallèle, dix-neuf extraits d'ADN ont également été envoyés pour séquencer également la portion V1-V2 de l'ARNr 16S. Les amorces utilisées pour cibler cette région variable sont 27F et 357R (Tableau 6).

Tableau 6 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour le séquençage des régions V4 et V1-V2 de l'ARNr 16s par l'entreprise Genome Quebec avec la technologie Illumina MiSeq PE250. La signification des symboles représentant les différents nucléotides est indiquée dans le tableau 1 au sein de la liste des abréviations.

Région de l'ARNr 16S	Nom de l'amorce	Fonction	Séquence 5'-3'	Taille de l'amplicon (pb)
V4	515F	Amorce sens	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	388
	806R	Amorce anti-sens	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	
V1-V2	27F	Amorce sens	GAGTTTGATCNTGGCTCAG	460
	357R	Amorce anti-sens	CTGCWGCCNCCCGTAGG	

Le séquençage du fragment V1-V2 codant pour l'ARN ribosomique 16S a été réalisé pour dix-neuf échantillons dans l'objectif d'obtenir une assignation taxonomique au rang de l'espèce plus discriminante que celle obtenue à partir de la région V4. Cette hypothèse a été formulée à partir des alignements de séquences exposés dans les annexes 1 et 2. Ils représentent les séquences ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S des souches de

référence ainsi que des souches polynésiennes dont le génome complet a été séquencé (données non publiées) qui appartiennent au genre *Tenacibaculum*. Ils ont été réalisés à partir de la base de données EzBioCloud. La figure correspondant à l'alignement de la région V4 est disponible en annexe 1 et celle de la région V1-V2 se trouve en annexe 2. On constate que la région V1-V2 présente une variabilité interspécifique plus importante pour les souches sélectionnées.

b) L'analyse bioinformatique

Les séquences ADN obtenues après séquençage ont été soumises à un traitement bioinformatique qui se décompose en différentes étapes (Figure 22). A partir des différentes séquences obtenues par échantillon, ce procédé vise à éliminer les erreurs dues au séquençage et à obtenir une assignation taxonomique pour ces séquences, par comparaison aux séquences renseignées dans une base de données (affiliation taxonomique réalisée en utilisant la banque de donnée Silva).

Pour les besoins de cette étude, les outils bio-informatiques Trim galore (0.6.4) et dada2 (version 1.16.0) ont été utilisés lors la première étape du traitement des données (pré-process). Puis le Pipeline dada2 a permis d'effectuer le traitement des séquences. Il se décompose en trois étapes: « *denoising* », « *déchimérisation* », et assignation taxonomique. Ensuite, le logiciel R (version 4.0.5 2021-03-31) via l'interface Rstudio (version 1.4.1106) a servi à extraire et mettre en forme les résultats par le biais de plusieurs packages de R dont dada2 (version 1.16.0) et phyloseq (version 1.32.0) pour l'analyse des séquences, ggplot2 (version 3.3.5) et RcolorBrewer (version 1.1-2) pour la présentation des résultats et quelques fonctions d'autres packages dont Biostrings (version 2.58.0), Rmisc (version 1.5) ou Rccp (version 1.0.6), stringr (version 1.4.0), etc. Les analyses statistiques ont été réalisées avec les packages ggpubr (version 0.4.0) et pairwiseAdonis (version 0.0.1). La base de données utilisée pour l'assignation taxonomique est la base Silva (version 138.1). Elle se subdivise en deux catégories rassemblant les séquences codant pour les grandes (LSU : *large subunit*) et les petites (SSU : *small Subunit*) sous unités ribosomiques. Le fichier SSU utilisé rassemble plus de 510 000 séquences codant pour les sous unités 16S et 18S.

En amont de l'emploi du logiciel R, le traitement des séquences depuis le pré-process jusqu'à l'assignation taxonomique a été réalisé via le supercalculateur DATARMOR. Il s'agit d'une infrastructure de stockage, calcul et traitement de données utilisée communément par les centres IFREMER et fonctionnant sous Linux. Le logiciel MobaXterm a servi d'interface entre le supercalculateur et le poste informatique utilisé fonctionnant sous Windows.

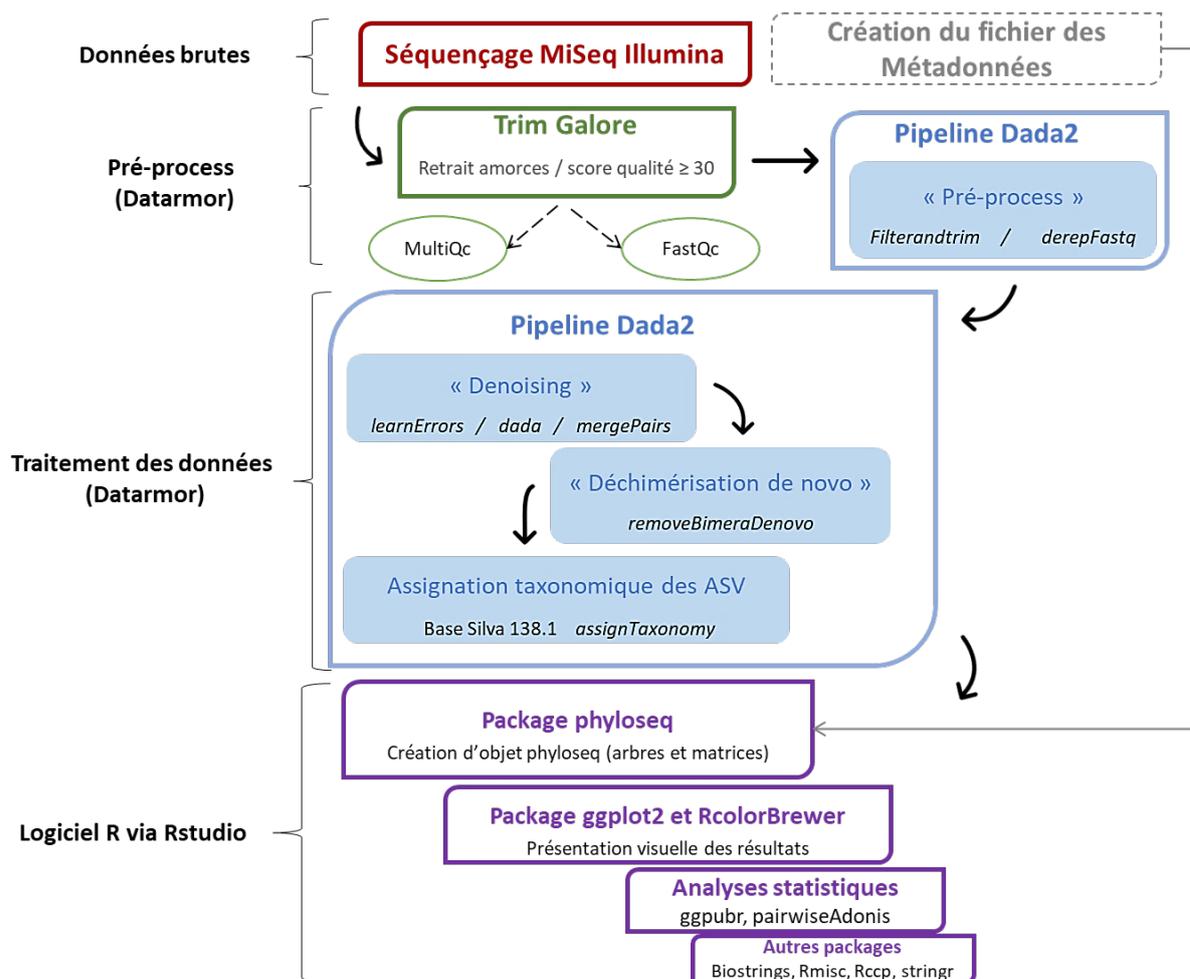


Figure 22 : Représentation schématique des différentes étapes réalisées pour le traitement des données de métabarcoding.

- Le « Pré-process »

L'étape de pré-process débute à partir des séquences brutes obtenues à l'issue du séquençage par la technologie Illumina (MiSeq PE250). Cette étape consiste à retirer les amorces sens et anti-sens présentes aux extrémités des séquences et à effectuer un premier tri pour éliminer les lectures comportant des erreurs de séquençage (Figure 23). Lors de cette étape sont donc éliminées : les séquences ayant un mauvais score de qualité, de longueur trop courte ou excessivement longue ou encore contenant des bases inconnues de type N, M, W, V, etc (Tableau 1 de la liste des abréviations).

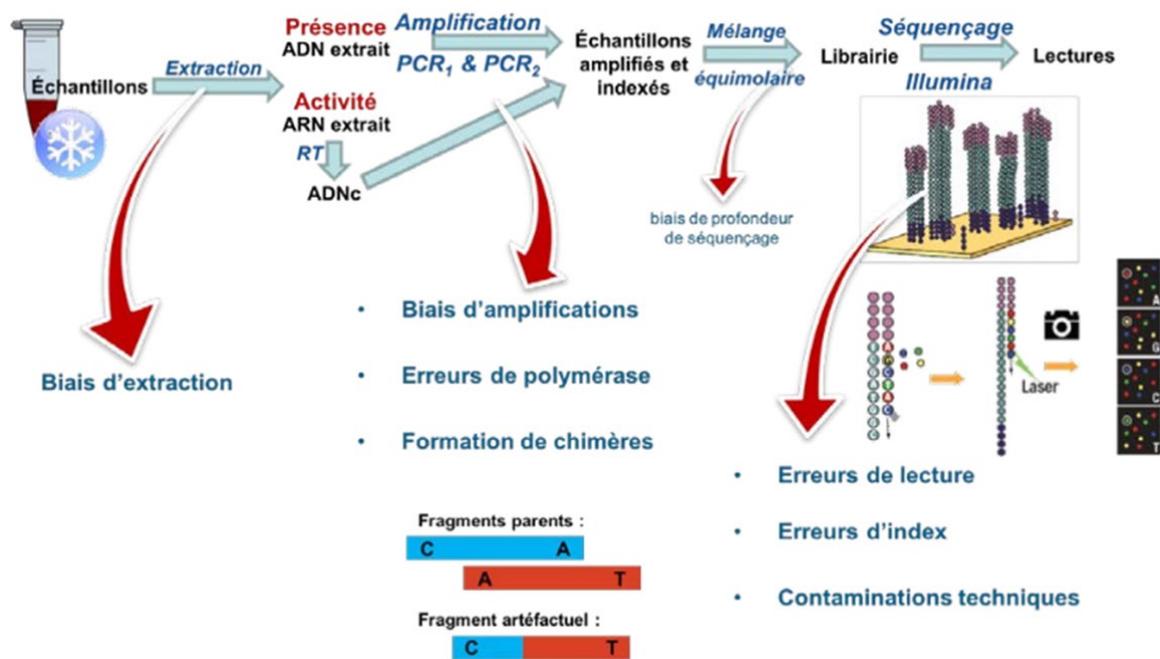


Figure 23 : Présentation des principaux biais techniques et biologiques survenant de l'extraction de l'ADN à l'étape de séquençage (Falentin et al. 2019)

Pour chaque échantillon, deux fichiers l'un en format fastq et l'autre de format md5, permettant de vérifier l'intégrité du fichier fastq après téléchargement, sont rendus disponibles par l'entreprise GenomeQuebec. À l'aide de l'outil TrimGalore (version 0.6.4), les séquences initiales ont été traitées en retirant les fragments d'ADN correspondant aux amorces sens et anti-sens. Un tri permettant d'éliminer les séquences de mauvaise qualité (score inférieur à 30) est fait simultanément.

Dans un premier temps, il avait été choisi d'avoir recours à l'outil BBDuk pour éliminer les amorces de séquençage et effectuer un premier tri de qualité. Les amorces utilisées lors du séquençage avaient été renseignées afin de compléter la base de données, contenant des amorces Illumina et Nexterra, déjà utilisées par l'outil. Le pourcentage de séquences conservées après tri sur le critère de la qualité des lectures (ou *Trimmed Sequences*) était de 99,21% par rapport aux données brutes. En revanche, l'outil conservait des lectures de mauvaise qualité pour quelques échantillons comme cela est présenté en annexe 3. N'étant pas parvenu à trouver un compromis entre le fait d'imposer un score de qualité suffisant sans supprimer un trop grand nombre de séquence, il a été choisi de s'orienter vers l'outil Trim Galore pour réaliser cette étape. Ce dernier a permis d'obtenir une qualité des lectures

satisfaisante (score de qualité ≥ 30) tout en conservant 98,61% des séquences. Les échantillons ne contenant plus de séquences sont éliminés automatiquement par cet outil.

Le pré-process est complété par un second filtre contrôlant le score de qualité des séquences via le pipeline dada2. Puis une étape de « déréplication » qui consiste à conserver un exemplaire de chacune des séquences qui pourrait être identifiée à plusieurs reprises est réalisée.

- Le « denoising »

Le procédé de « denoising » est réalisé au cours du pipeline dada2. L'objectif de cette étape est de corriger les erreurs de séquençage fondées sur des modèles d'erreurs établis. Le pipeline dada2 utilise la fonction learnErrors afin d'évaluer le taux d'erreur de séquençage pour chaque substitution d'un nucléotide par un autre. Puis, la fonction dada est lancée à partir des séquences « dérépliquées » afin de renseigner la composition des « séquences uniques » détectées dans les échantillons. Il s'agit de répertorier un exemplaire de chaque séquence observée dans un échantillon.

Le procédé de « denoising » s'oppose à l'approche par « clustering », proposée par d'autres outils de métabarcoding, qui regroupe quant à elle les lectures ayant un fort pourcentage d'identité et qui correspondront à une même assignation taxonomique.

Les séquences complémentaires des deux brins d'ADN sont ensuite associées par la fonction mergePairs.

- La « déchimérisation »

Au cours du séquençage, des chimères peuvent se créer à partir d'un amplicon avorté qui tient lieu d'amorce au cours d'un cycle suivant pour l'élongation d'une séquence d'un autre micro-organisme. Elle est alors constituée par plusieurs fragments de séquences correspondant à différentes entités. Le procédé d'obtention d'une chimère est représenté ci-après sur la figure 24 et correspond à un complément d'information expliquant l'obtention du fragment artéfactuel présenté sur la figure 23.

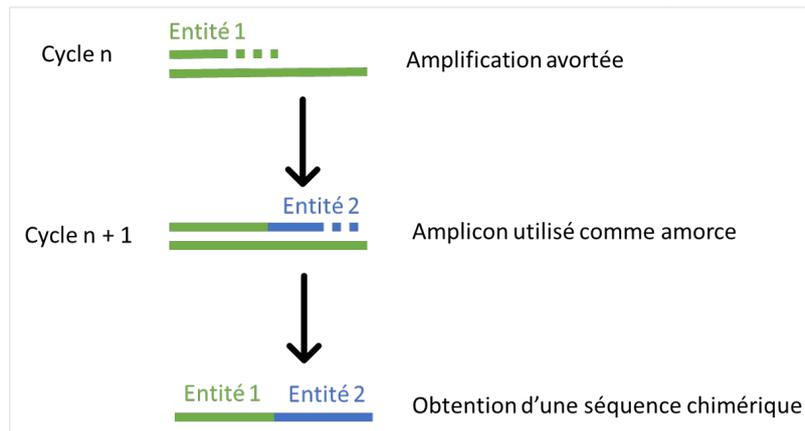


Figure 24 : Représentation schématique de l'obtention d'une chimère au cours du séquençage

Il existe deux stratégies pour éliminer les chimères : la déchimérisation sur référence, qui élimine les lectures pour lesquelles un alignement est détecté sur plusieurs taxons différents d'une base de données, et la déchimérisation *de novo* qui procède à un alignement sur les séquences présentes en grande quantité dans l'échantillon. La technique sur référence n'est pas adaptée à l'étude de milieux pour lesquels la plupart des séquences des organismes présents ne sont pas référencées dans les banques de données. De plus ces dernières comportent souvent des séquences chimériques qui ne seront donc pas détectées au cours des traitements de données. Pour cette étude, la méthode de déchimérisation *de novo* a été réalisée à l'aide de la fonction `removeBimeraDenovo`.

L'étape de déchimérisation aboutit à l'obtention des ASVs (de l'anglais *amplicon sequence variant*), qui correspondent aux différents variants de séquence des amplicons. Les ASVs sont les différentes « séquences ADN uniques » répertoriées après l'élimination des séquences parasites générées pendant les étapes d'amplification et de séquençage. Les séquences de deux ASVs peuvent ne différer que d'un seul nucléotide.

- L'assignation taxonomique

La taxonomie des ASVs a tout d'abord été attribuée à partir de la base de données RefSeq (RefSeq-RDP16s_V2) qui réunit les séquences de référence du génome, des transcriptomes et des protéines de divers organismes (archées, bactéries, eucaryotes et virus). C'est une base de données d'intérêt, notamment dans l'étude du microbiote humain. En revanche, les assignations taxonomiques obtenues à partir de cette base de données n'étaient pas satisfaisantes dans le cadre de notre étude car il y avait une perte d'information pour certains rangs taxonomiques intermédiaires. Dans un second temps, il a donc été choisi de se

référer à la base de données Silva rassemblant plus de 510 000 séquences codant pour les petites sous-unités ribosomiques 16S et 18S (version 138.1). L'assignation taxonomique obtenue ainsi était satisfaisante.

c) L'analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques sont réalisées à partir du package phyloseq (version 1.32.0) et représentées par des graphiques construits à partir du package ggplot2 (version 3.3.5). Le test de Wilcoxon a servi à établir si les différences d' α -diversité entre les groupes d'échantillons sont significatives. Les packages ggpubr (version 0.4.0) et pairwiseAdonis (version 0.0.1) ont permis d'obtenir les p-value des données d' α -diversité et de β -diversité respectivement.

Les variables étudiées sont :

- La nature et l'abondance relative des ASV identifiés
- Les indices d' α -diversité : le nombre d'ASV différents observés (*Observed*), les indices de Shannon et Simpson
- La β -diversité : la distance de Bray-Curtis

Les effets fixes considérés sont : la nature de l'échantillon (bioencrassement des structures d'élevage, eau de filtration, larve de platax, platax asymptomatique, platax symptomatique) et le site de prélèvement. On s'intéresse plus particulièrement à des différences de composition du microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques et symptomatiques lors des épisodes de ténacibaculose étudiés ainsi que des distinctions au sein des microbiotes des deux sites d'élevages Taha'a et Toahotu. On s'intéresse également à l'assignation taxonomique obtenue à partir du séquençage des régions V4 et V1-V2 de l'ADN ribosomique 16S.

Dans le cadre de cette étude, chaque échantillon est considéré comme un peuplement dont on étudie la diversité en micro-organismes. Néanmoins, il est aussi intéressant de regrouper des échantillons de même nature ou prélevés sur le même site pour les considérer comme un même peuplement.

▪ Les indices d' α -diversité

Les indices d' α -diversité concernent la diversité spécifique dans un peuplement. Chacun de nos échantillons constitue alors un peuplement dont on étudie la composition en micro-organismes.

L'indice de diversité le plus couramment employé est l'indice de Shannon (H') qui est la probabilité de rencontrer une espèce précise parmi un ensemble d'espèces. Si sa valeur est nulle alors une seule espèce est présente tandis que la valeur maximale (Hmax=log2(S)) est atteinte lors d'une répartition homogène des espèces dans le peuplement.

L'indice de Simpson (P(ω)) est la probabilité que deux individus pris au hasard appartiennent à la même espèce dans un peuplement. Plus cet indice est proche de 1, plus le peuplement est homogène (Figure 25).

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2(p_i) \qquad P(\omega) = \sum(p_i^2)$$

pi : abondance proportionnelle d'une espèce présente (pi = ni/N).
ni : nombre d'individus dénombrés pour une espèce présente.
N : nombre total d'individus dénombrés, toute espèce confondue.
S : nombre total de la liste d'espèces présentes.

Figure 25 : Définition des indice d'α-diversité Shannon (H') et Simpson (P(ω))

- La β-diversité

La β-diversité mesure la dissimilarité entre communautés considérées généralement par paires. Il faut prendre en considération qu'elle est très sensible à la taille des communautés échantillonnées.

La distance de Bray-Curtis évalue la dissimilarité d'abondance de taxons entre deux échantillons. Elle est comprise entre 0 (les deux échantillons ont la même composition) et 1 (les échantillons sont totalement dissemblables) (Figure 26).

$$\delta_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^s |Y_{ij} - Y_{ik}|}{\sum_{i=1}^s (Y_{ij} + Y_{ik})} = 1 - \frac{2W}{A + B}$$

Y_{ij} = valeur pour la ième espèce du jème échantillon
Y_{ik} = valeur pour la ième espèce du kème échantillon
δ_{jk} = dissimilarité entre le jème et le kème échantillon pour les s espèces
A = somme des abondances de toutes les espèces trouvées dans un échantillon donné
B = somme des abondances des espèces d'un autre échantillon
W = somme des valeurs d'abondance les plus faibles pour chaque espèce commune aux deux échantillons

Figure 26 : Définition de la distance de Bray-Curtis

La diversité entre les échantillons calculée à partir des distances de Bray-Curtis est représentée par des graphiques en nuages de points. Chaque point représente un échantillon et la distance entre chaque point représente leur éloignement qui est exprimé par une échelle multidimensionnelle non métrique, ou NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). Il est important de prendre en considération la valeur de « stress » de la NMDS pour l'interprétation de ces figures. Cette donnée représente la différence entre la configuration en deux dimensions et les valeurs calculées par la régression. Une valeur de stress supérieure ou d'environ 0,2 est considérée comme douteuse, et une valeur approchant 0,3 est le signe d'une représentation graphique arbitraire. Pour une valeur de stress égale ou inférieure à 0,1 la représentation est raisonnable, tandis qu'une valeur égale ou inférieure à 0,05 indique une bonne concordance.

2. Résultats

a) Les résultats du séquençage et du traitement bio-informatique

En amont du séquençage, l'amplification de l'ADN cible a été réalisée avec succès pour 142 des 153 échantillons séquencés sur la région V4 et 16 des 19 échantillons de la région V1-V2. Les échantillons n'ayant pas pu être amplifiés correspondent en grande majorité à des échantillons de matière organique déposée sur les structures d'élevage, de type algue (ou bio-encrassement de l'anglais *biofouling*), pour lesquels la présence d'inhibiteurs avait été détectée. Ils sont traités conjointement aux autres échantillons lors du traitement bio-informatiques des données, puis ils sont ensuite éliminés, avant la présentation et l'exploitation des résultats.

A l'issue du séquençage, un pool de plus de 41 000 séquences d'ADN bactérien a été obtenu en moyenne pour chaque prélèvement. Le tableau 7 présente le nombre de séquences en entrée et en sortie des étapes bio-informatiques essentielles. Les nombres sont présentés en nombre de lectures équivalent à de l'ADN double brin, hormis pour les étapes de « Denoising » qui sont réalisées séparément à partir des brins d'amorce sens (F) et anti-sens (R). On constate que les premiers filtres permettent de conserver la plupart des lectures tandis que le processus de « Déchimérisation » est l'étape qui élimine la plus grande proportion de séquences

Tableau 7 : Présentation du nombre de séquences conservées à l'issue des étapes de traitement bio-informatique réalisé avec les outils TrimGalore et dada2. Les nombres de séquences sont présentés en équivalent à de l'ADN double brin, hormis pour les étapes de « Denoising » qui sont réalisées séparément à partir des brins d'amorce sens (F) et anti-sens (R)

Procédé de traitement	Données Brutes	Pré-process (Trim galore)	Filtre dada2	« Denoising F »	« Denoising R »	Assemblage des brins « Merged »	« Déchimérisation »
Sortie (nbr séquences totales des échantillons)	7 302 542	7 201 067	7 033 297	6 974 561	6 947 791	6 569 311	4 727 925
Séquences conservées par l'outil (%)	/	98,61%	97,67%	99,16%	99,61%	94,55%	71,97%
Moyenne par échantillon (nbr séquences)*	41 729	41 149	40 190	39 855	39 702	37 539	27 017

* On considère l'ensemble des 175 échantillons analysés simultanément. A savoir les 156 échantillons ayant été prélevés au cours de la campagne d'échantillonnage, dont 3 ne sont pas exploités dans ce document, et parmi lesquels 19 prélèvements ont été dupliqués pour être analysés sur les régions V1-V2 et V4.

A l'issue du traitement bioinformatique par le pipeline dada2, les échantillons comportent une moyenne de 27 017 séquences, or certains échantillons (n=15) n'en contiennent aucune (Figure 27). Il s'agit des échantillons n'ayant pas été amplifiés correctement avant le séquençage. Ces derniers sont donc supprimés avant l'exploitation des données. Les échantillons conservés sont traités distinctement selon la région de l'ADN ribosomique 16S ayant été séquençé V4 (n=142) et V1-V2 (n=16).

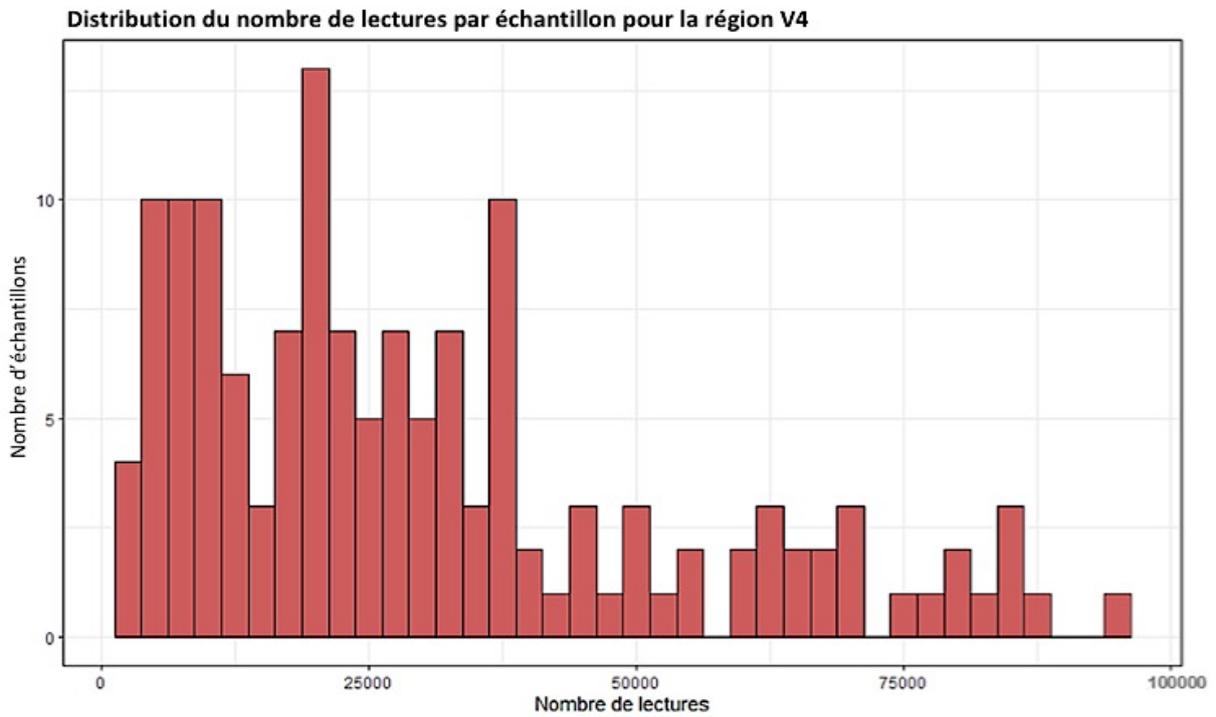


Figure 27 : Distribution du nombre de séquences par échantillon pour la région V4, à l'issue du traitement bio-informatique.

Les échantillons conservés pour la région V4 comportent une moyenne de 30 200 lectures chacun. Le nombre de lecture est très variable selon les échantillons car il s'étend de 2 609 lectures pour la valeur la plus faible à plus de 93 000 pour l'échantillon contenant le plus grand nombre de séquences (Figure 27). Ceux de la région V1-V2 contiennent environ 26 000 séquences en moyenne pour une valeur minimale autour de 8 800 séquences par échantillon et une valeur maximale de plus de 61 000 séquences (Figure 28).

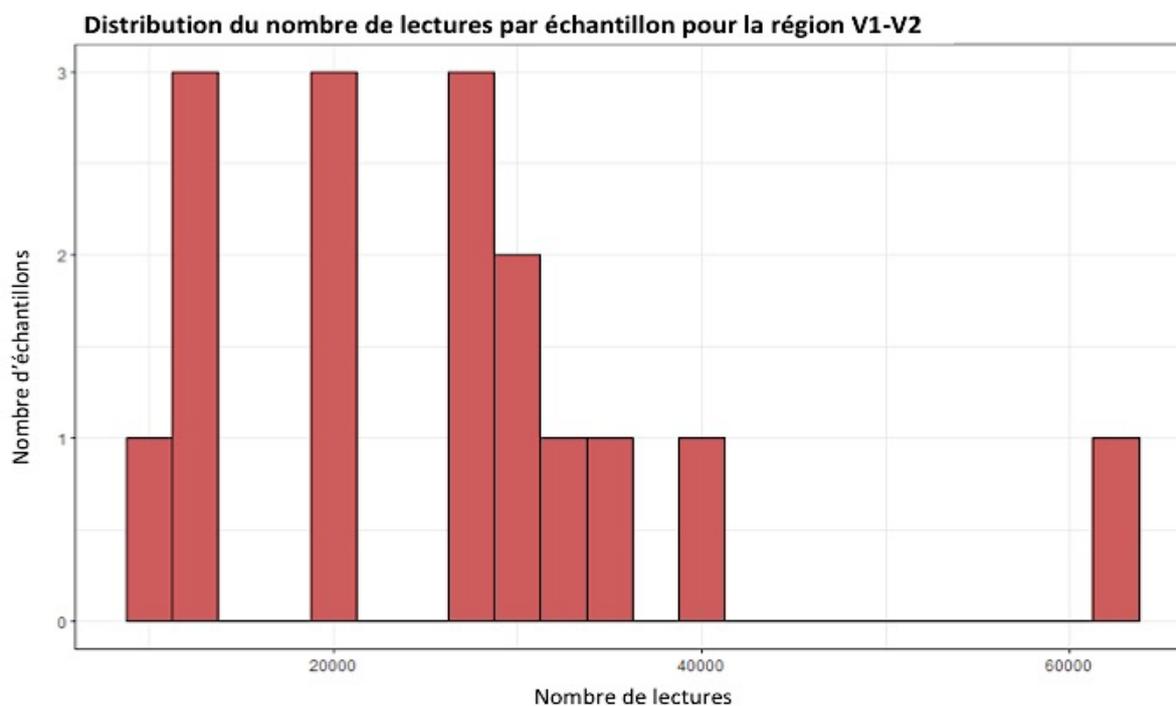


Figure 28 : Distribution du nombre de séquences par échantillon pour la région V1-V2, à l'issue du traitement bio-informatique.

L'assignation taxonomique à partir de la base de données Silva a permis d'obtenir un total de 13 712 ASV retrouvés pour l'ensemble des échantillons séquencés sur les régions V4 et V1-V2, qui ont été traités conjointement. Un total de 737 ASVs sont assignés à une taxonomie relative au genre *Tenacibaculum*.

b) Présentation de la diversité microbienne des échantillons

Les figures suivantes (Figure 29, Figure 30, Figure 31) constituées à partir des 800 ASVs majoritaires parmi les 13 712 ASV identifiés. Les figures 28 et 29 présentent tout d'abord les taxons majoritaires identifiés selon les différentes natures d'échantillon dans chaque site. L'assignation taxonomique est présentée au rang de la famille puis du genre. Pour ces deux figures, les abondances des taxons représentées prennent en compte le nombre d'échantillons de chaque catégorie. La quantité d'échantillon par lieu de prélèvement et par nature est abordée lors de la présentation de la campagne des échantillons dans la seconde partie au paragraphe I.1) et synthétisée par la figure 18. Ensuite, la représentation des résultats est détaillée en présentant l'abondance taxonomique à une précision du genre de chaque échantillon ayant été conservé à l'issue du traitement bio-informatique (Figure 31).

- Synthèse de la composition en microorganisme de chaque type de prélèvement dans les différents sites

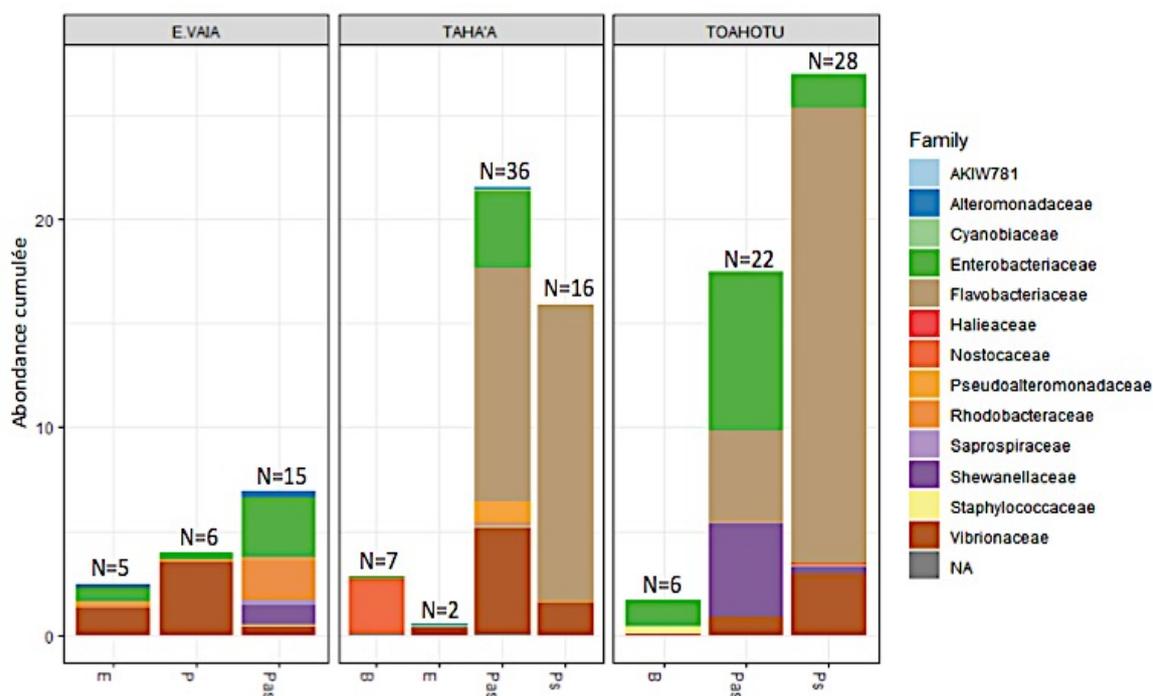


Figure 29 : Présentation de l'abondance des taxons de microorganismes, avec une précision à l'échelle de la famille, selon la nature de l'échantillon dans les différents sites d'élevage. La nature des prélèvements concerne le bio-encrassement des structures d'élevage (B), l'eau de filtration (E), les larves de platax (P), les platax asymptomatiques (Pas) et les platax symptomatiques (Ps). Les résultats sont en abondance cumulée pour les échantillons de chaque catégorie.

Sur la figure 29, représentant les familles bactériennes identifiées dans chaque catégorie de prélèvement selon les sites, on observe trois assignations majoritaires : Les flavobactéries, auxquelles appartient l'agent *T. maritimum* identifié comme responsable de la maladie en Polynésie française, les entérobactéries et les vibrionacées.

Le taxon des flavobactéries n'est identifié en abondance relativement importante qu'au cours de l'infection naturelle sur les sites de Taha'a et Toahotu, sur les platax asymptomatiques comme symptomatiques. On remarque également que le microbiote tégumentaire des platax symptomatiques semble comprendre des flavobactéries en grande quantité tandis que les autres taxons observés sont en plus faible abondance. Pour les platax asymptomatiques les différents taxons sont dans des proportions relatives plus homogènes bien que les flavobactéries soient majoritaires. Les entérobactéries notamment sont présentes en plus faible abondance chez les platax symptomatiques par comparaison aux platax asymptomatiques. L'abondance des vibrionacées ne semble pas dépendre du caractère symptomatique ou asymptomatique des animaux. Ce taxon n'est que très peu retrouvé dans

les prélèvements de bio-encrassement. En revanche, on retrouve la famille des *Pseudoalteromonadaceae* sur les platax asymptomatiques, du site de Taha'a plus précisément, qui réunit de nombreuses espèces produisant des métabolites d'intérêt ayant des propriétés antibactériennes et antivirales (Ivanova et al. 2014 ; Offret et al. 2016).

Autrement, on remarque une différence marquée entre la composition du microbiote prélevé sur les structures d'élevage (bio-encrassement) du site de Taha'a, où il se compose majoritairement de *Nostocaceae*, une famille de cyanobactéries, et du site de Toahotu où l'on observe surtout des familles de protéobactéries avec des entérobactéries et des *Staphylococaceae*. Pour rappel, les histogrammes représentant les échantillons de bio-encrassement sont de faible abondance cumulée compte tenu du faible nombre d'échantillons de cette catégorie. On remarque sur la figure 31 que pour ces échantillons de bio-encrassement ici représentés individuellement, parfois l'abondance des taxons majoritaires est proche de 1 et d'autres fois elle est très faible pour d'autres échantillons. Dans ces derniers cas, il est probable que les échantillons soient composés d'un ensemble de taxons minoritaires qui n'ont pas été représentés.

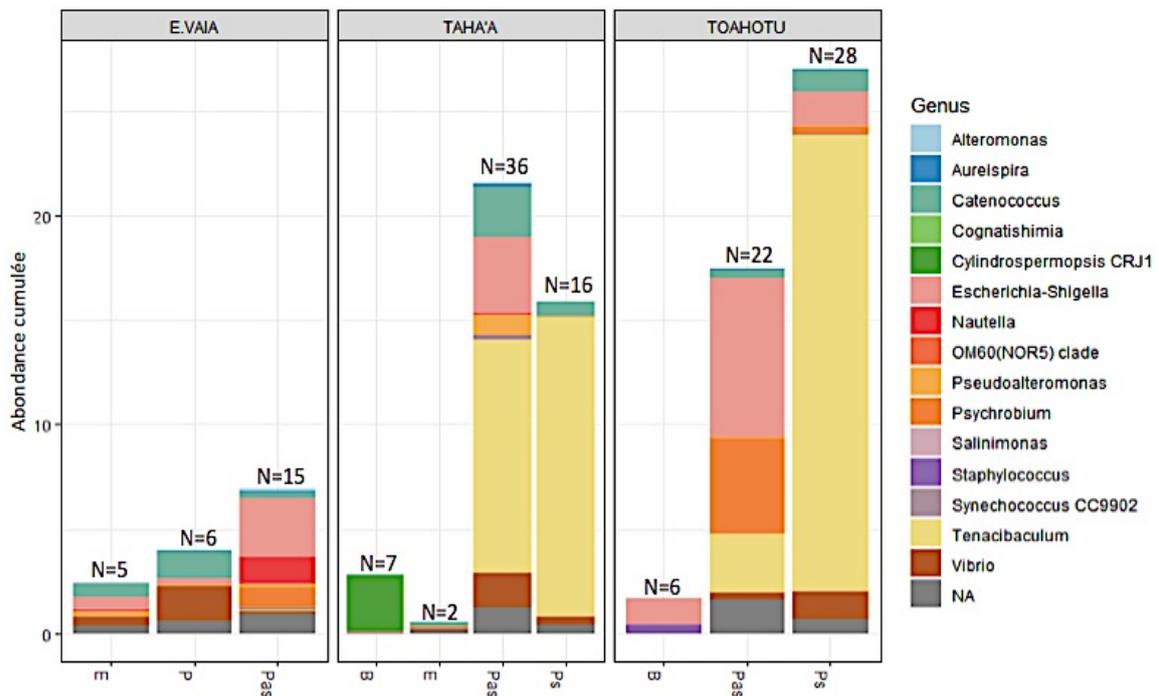


Figure 30 : Présentation de l'abondance des taxons de microorganismes, avec une précision à l'échelle du genre, selon la nature de l'échantillon dans les différents sites d'élevage. La nature des prélèvements concerne le bio-encrassement des structures d'élevage (B), l'eau de filtration (E), les larves de platax (P), les platax asymptomatiques (Pas) et les platax symptomatiques (Ps). Certains taxons ne sont plus assignés (NA) pour une précision au niveau du genre.

On retrouve bien une organisation similaire entre les figures 29 et 30 qui ne diffèrent que par la précision du rang taxonomique représenté, à savoir la famille puis le genre respectivement. On observe ainsi que la famille des *flavobacteriaceae* représente le genre *Tenacibaculum* exclusivement, les vibronacées se répartissent en deux catégories majoritaires avec le genre *Vibrio* et le genre *Catenococcus*, les entérobactéries appartiennent principalement aux genres *Escherichia* et *Shigella* et la famille des *Rhodobacteraceae* comprend le genre *Nautella*. On remarque que certaines affiliations au niveau de la famille ne sont plus identifiées précisément au niveau du genre et sont classifiées comme non attribuées (NA).

L'assignation taxonomique au rang de l'espèce n'a pu être attribuée que pour cinq ASVs (sur un total de 13 712 ASV), dont deux d'entre eux sont identifiés comme l'espèce *Tenacibaculum maritimum*, l'agent identifié comme responsable des épisodes de ténacibaculose en Polynésie française. Il s'agit des 68^{ème} et 13 522^{ème} ASVs les plus abondants pour les échantillons de la région V4. Cependant, l'espèce apparaît extrêmement peu abondante une fois rapportée aux autres taxons qui sont non assignés pour une précision au rang de l'espèce. Il est néanmoins très probable que de nombreux autres ASVs, identifiés comme appartenant au genre *Tenacibaculum* mais n'ayant pas pu être assignés au rang de l'espèce, correspondent également à l'espèce *T. maritimum*. En dépit de l'hypothèse selon laquelle le séquençage de la région V1-V2 permettrait d'obtenir une meilleure analyse taxonomique au rang de l'espèce, aucune assignation aussi précise n'a été possible pour les échantillons séquencés sur cette région.

- Observation des principaux taxons identifiés selon les sites

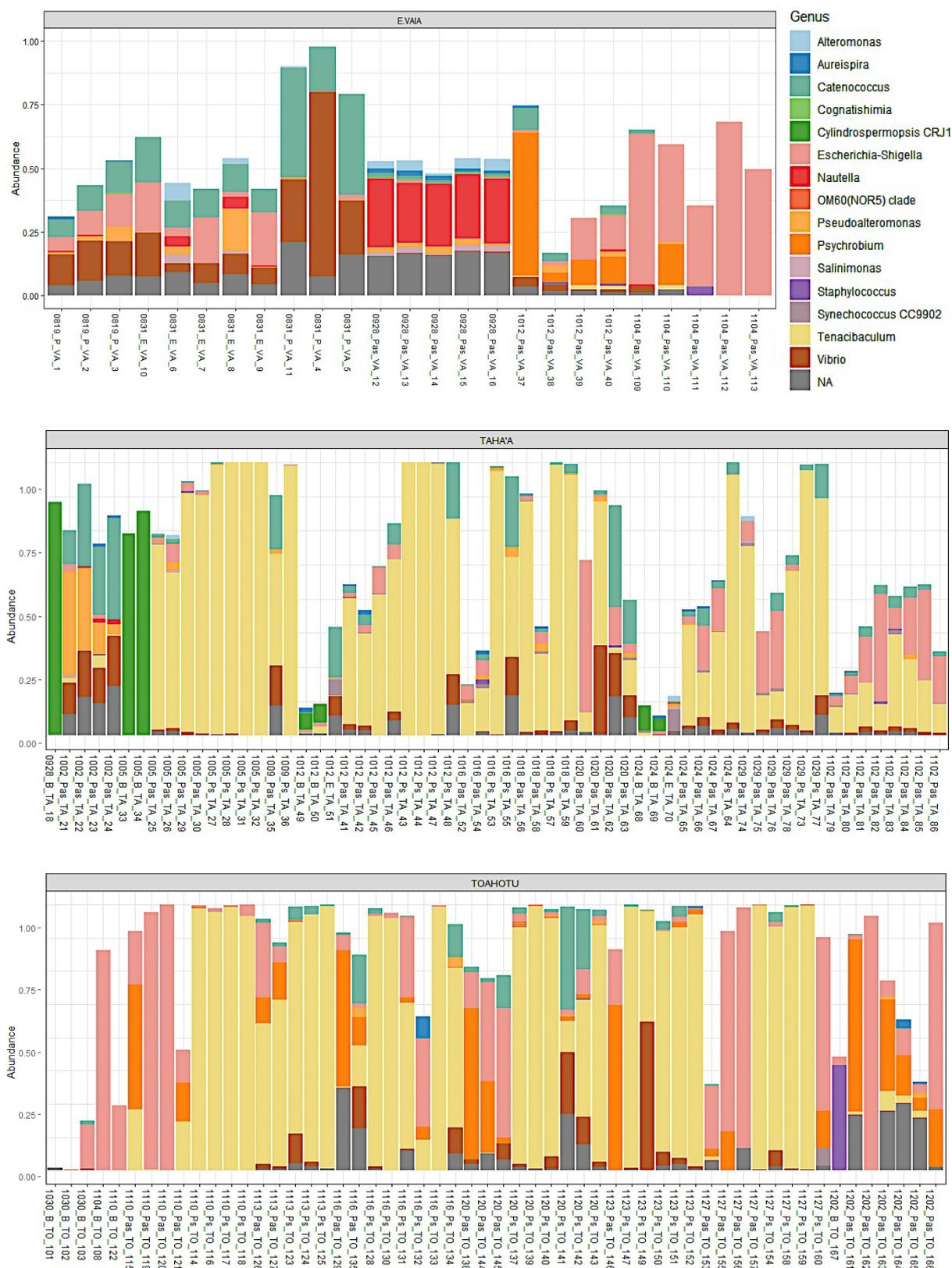


Figure 31 : Présentation de l'abondance des principaux taxons identifiés dans les échantillons à partir du séquençage de la région V4 (amorces 515F/806R). Les prélèvements sont organisés selon le site d'élevage concerné (Ecloserie Vaia, Ferme de Taha'a et Ferme de Toahotu). Les échantillons sont présentés en fonction des sites sur lesquels ils ont été prélevés, puis ils sont ordonnés par ordre chronologique de prélèvement. Pour une même date, s'ils ont été échantillonnés, on trouve dans l'ordre : les prélèvements de bioencrassement des structures d'élevage (B), puis l'eau de filtration (E), les larves de platax (P), les platax asymptotiques (Pas) et pour finir les platax symptomatiques (Ps).

A partir de la figure 31, on constate tout d'abord que les échantillons de l'écloserie Vaia contiennent des communautés bactériennes très homogènes par date de prélèvement. Les oeufs du 19 août ont une composition du microbiote riche en entérobactéries et très similaire à l'eau d'élevage prélevée le 31 août. En revanche les platax échantillonnées le 31 août présentent un microbiote différent, les entérobactéries semblent être très minoritaires. Le 28 septembre, après métamorphose, les genres *Vibrio* et *Catenococcus* semblent disparaître au profit du genre *Nautella* (*Rhodobacteraceae*). Enfin le 12 octobre, en condition non biosécurisée, les entérobactéries sont de nouveau présentes avec toutefois plus de variabilité d'abondance selon les platax considérés.

A première vue, le genre *Tenacibaculum* est très abondant sur les frottis des platax dans les deux fermes d'élevage et quasiment absent des prélèvements du site de l'écloserie Vaia. Cependant, on remarque également une présence de *Tenacibaculum*, en très faible abondance, sur quelques poissons asymptomatiques présents à Vaia à partir du 12 octobre. Il s'agit des poissons élevés en conditions non biosécurisées dans des bassins extérieurs en attendant leur transfert à 9 g sur le site de Toahotu. Sur les échantillons 0819_P_VA_2 et 0831_E_VA_6 présentés pour le site de Vaia, on observe une présence extrêmement faible du genre *Tenacibaculum* alors qu'il s'agit respectivement d'œufs de platax et d'eau en bassins biosécurisés. Ces informations ne sont pas ou peu visibles sur la figure 30, présentant la composition synthétique des différentes natures d'échantillons au rang du genre. L'hypothèse principale est qu'il s'agirait d'espèces de *Tenacibaculum*, *à priori* non pathogènes pour les poissons, comme *T. litopenaei* et *T. mesophilum* qui ont déjà été isolées sur milieu sélectif lors de campagnes d'échantillonnage réalisées à l'écloserie Vaia (données non publiées) et qui pourraient faire partie de la flore naturelle du *Platax orbicularis*, voire de nouvelles espèces de *Tenacibaculum* non encore décrites, mais identifiées au sein de la souchothèque mise en place par P. Lopez.

Par ailleurs, les histogrammes de la figure 31 confirment que la composition en microorganismes des platax asymptomatiques et des prélèvements de bio-encrassement des structures d'élevage semble être dissemblable selon les sites. Les platax asymptomatiques de l'écloserie Vaia présentent une majorité de *Nautella* (avec une abondance d'environ 0,3) lorsqu'ils sont en condition biosécurisée, puis les taxons majoritaires en bassins extérieurs sont *Escherichia-Shigella* et *Psychrobium*. On retrouve ces deux mêmes taxons en forte abondance sur le site de Toahotu, tandis qu'à Taha'a la présence de souches de *Psychrobium* n'est pas détectée dans les 800 taxons majoritaires représentés sur la figure 30. En proportion

plus modeste, on peut également citer le genre *Catenococcus* (une bactérie de la famille des Vibrionacées) présent pour quasiment toutes les natures d'échantillon, hormis le bio-encrassement.

Par une observation comparative globale des représentations pour les sites de Taha'a et de Toahotu, on remarque qu'à Taha'a moins de prélèvements de platax symptomatiques ont été échantillonnés à la fin de l'élevage. Plus particulièrement, les platax symptomatiques sont peu représentés au sein du dernier tiers des échantillons de Taha'a et ce, en comparaison avec le nombre de platax asymptomatiques prélevés dans la même ferme mais aussi en comparaison aux échantillons de même nature prélevés sur le site de Toahotu. Cela est cohérent avec les représentations des figures 29 et 30 qui affichaient de plus faibles valeurs d'abondances cumulées pour les platax symptomatiques de Taha'a, compte tenu du nombre d'échantillons impliqués.

Le microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques présente généralement une abondance en *Tenacibaculum* plus faible que les platax symptomatiques et d'autres taxons présents en plus grande abondance. Les platax asymptomatiques prélevés juste après le transfert depuis l'écloserie Vaia vers la ferme de Taha'a présentent une abondance en *Pseudoalteromonas* relativement conséquente mais ce taxon n'est rapidement que très peu représenté pour les prélèvements ultérieurs sur ce site.

On remarque non seulement que certains platax symptomatiques comme asymptomatiques prélevés au cours de l'infection naturelle dans les élevages sont porteurs d'une quantité de *Vibrio* relativement abondante, mais que les larves de platax de l'écloserie Vaia le sont aussi. L'abondance des souches de *Virbio* ne semble pas dépendante du site d'élevage, de la nature de l'échantillon ni même de la chronologie de l'infection naturelle.

c) Les analyses de diversité des échantillons selon la nature de l'échantillon et le site de prélèvement

L'un des objectifs majeurs de cette étude est de déterminer s'il existe une différence dans la composition du microbiote tégumentaire des platax symptomatiques et asymptomatiques au cours d'un épisode de ténacibaculose. La campagne d'échantillonnage portant sur deux sites distincts, il est aussi intéressant d'observer s'il existe des microbiotes différents selon les sites. Il faut cependant prendre en compte que les poissons ont été transférés sur les deux sites à des âges et poids différents ce qui peut également avoir une

influence (1g sur Taha'a et 9g sur Toahotu). Une observation dépendant du lieu d'élevage ne peut donc être dissociée d'un effet âge des animaux.

- Le microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques et symptomatiques au cours des épisodes infectieux de ténacibaculose des deux sites d'élevage (Taha'a et Toahotu)

La dénomination de platax asymptomatique réunit des poissons pouvant être classés en quatre catégories (Figure 18). Les poissons de la fin de l'élevage larvaire élevés en conditions biosécurisées, puis ceux échantillonnés sur le site de l'écloserie Vaia en condition non biosécurisée entre 1 g et 9 g, avant leur transfert sur la ferme de Toahotu et enfin les deux groupes de les platax échantillonnés au cours des épisodes infectieux des fermes d'élevages de Taha'a puis de Toahotu, ne présentant pas de symptômes ni lésions de ténacibaculose. Compte tenu des conditions d'élevage très différentes entre les quatre catégories de poissons asymptomatiques, seuls les platax prélevés dans les deux fermes d'élevage ont été considérés pour tenter de comparer le microbiote tégumentaire des animaux symptomatiques et asymptomatiques.

Les figures 29 et 30 suggèrent que les platax symptomatiques et asymptomatiques contiennent des taxons relativement similaires dans des proportions très différentes. Le taxon du genre *Tenacibaculum* notamment paraît plus abondant chez les poissons symptomatiques. Dans ce contexte, les indices d' α -diversité, permettant d'estimer la richesse en micro-organismes du microbiote tégumentaire de ces poissons et l'homogénéité des abondances, ont été établis. Seuls les prélèvements de poissons symptomatiques et asymptomatiques des deux fermes d'élevage ont été considérés.

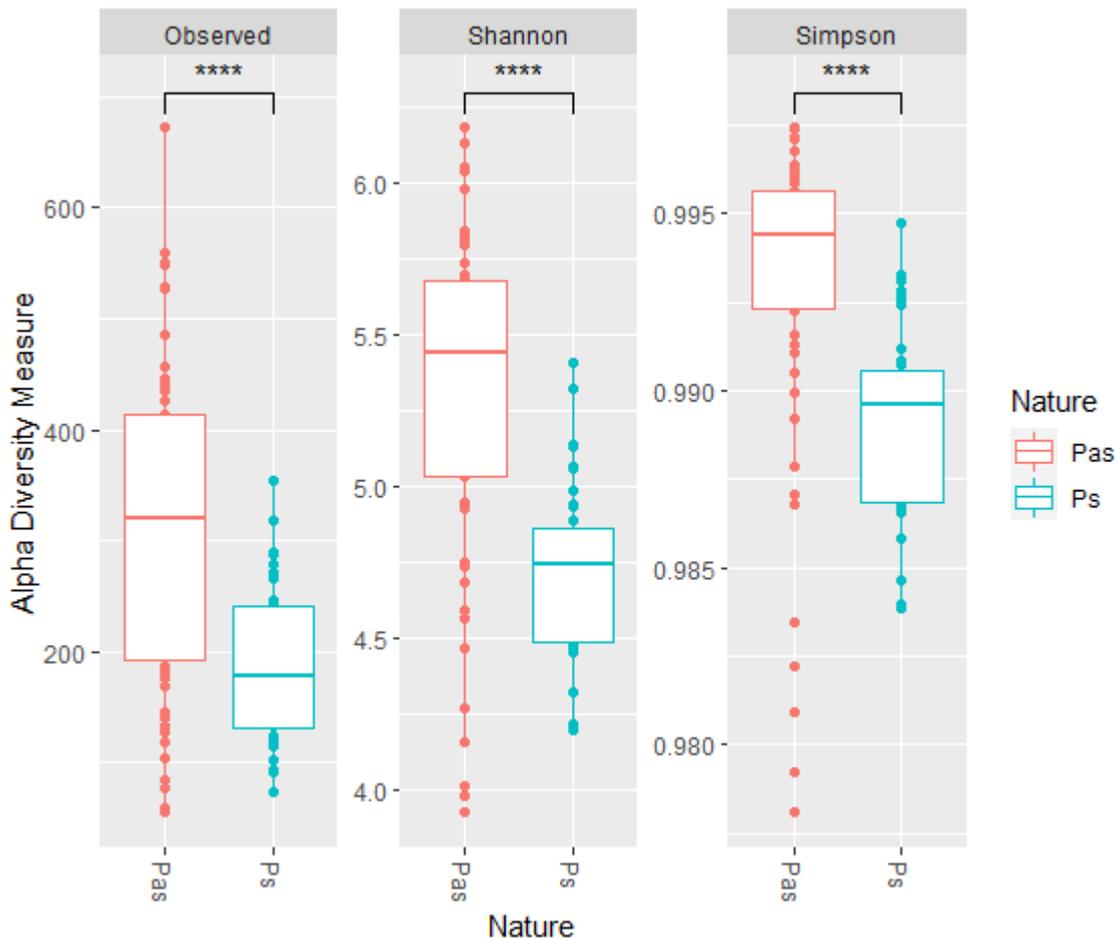


Figure 32 : Les indices d' α -diversité des platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) : Observed (richesse spécifique), indices de Shannon et Simpson. Le symbole « **** » représente une p-valeur inférieure à 0.0001 ce qui indique une différence fortement significative entre les deux groupes.

La figure 32 indique la valeur des indices d' α -diversité (taxons observés, Shannon et Simpson) pour chaque échantillon de platax en les organisant selon s'il s'agit de platax désignés comme asymptomatiques ou symptomatiques. La représentation des diagrammes en boîte permet de faire des observations statistiques à partir de l'ensemble des échantillons de ces catégories.

On s'intéresse plus particulièrement à établir si le microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques possède une richesse en microorganismes plus importante que celui des platax symptomatiques. En effet, dans l'étude de Le Luyer sur le microbiote tégumentaire de platax en conditions d'infection expérimentale, le groupe de poissons 24h après l'infection présentait une richesse en microorganismes (indice de Shannon) plus faible que le groupe contrôle (Le Luyer et al. 2020). On retrouve un résultat similaire dans notre étude, en prenant en compte les prélèvements de platax tout au long des épisodes infectieux : les poissons symptomatiques ont un indice de Shannon et de Simpson plus faible que les platax

asymptomatiques, ils présentent donc une biodiversité du microbiote tégumentaire (richesse spécifique en microorganismes et abondance relative des différents taxons) statistiquement inférieure. On remarque cependant que de rares échantillons de platax asymptomatiques (n= [2-5] selon l'indice considéré) échappent à cette tendance globale et ont des indices d' α -diversité inférieurs à ceux des platax symptomatiques. Il s'agit en effet d'un groupe d'échantillons présentant des indices d' α -diversité relativement variables. Cependant, c'est aussi le groupe rassemblant le plus grand nombre d'échantillons. Au cours des épisodes de ténacibaculose des deux fermes d'élevage (sans les prélèvements sur le site de l'écluserie Vaia), les échantillons de platax asymptomatiques considérés sont au nombre de 58 et ceux des platax symptomatiques sont au nombre de 44.

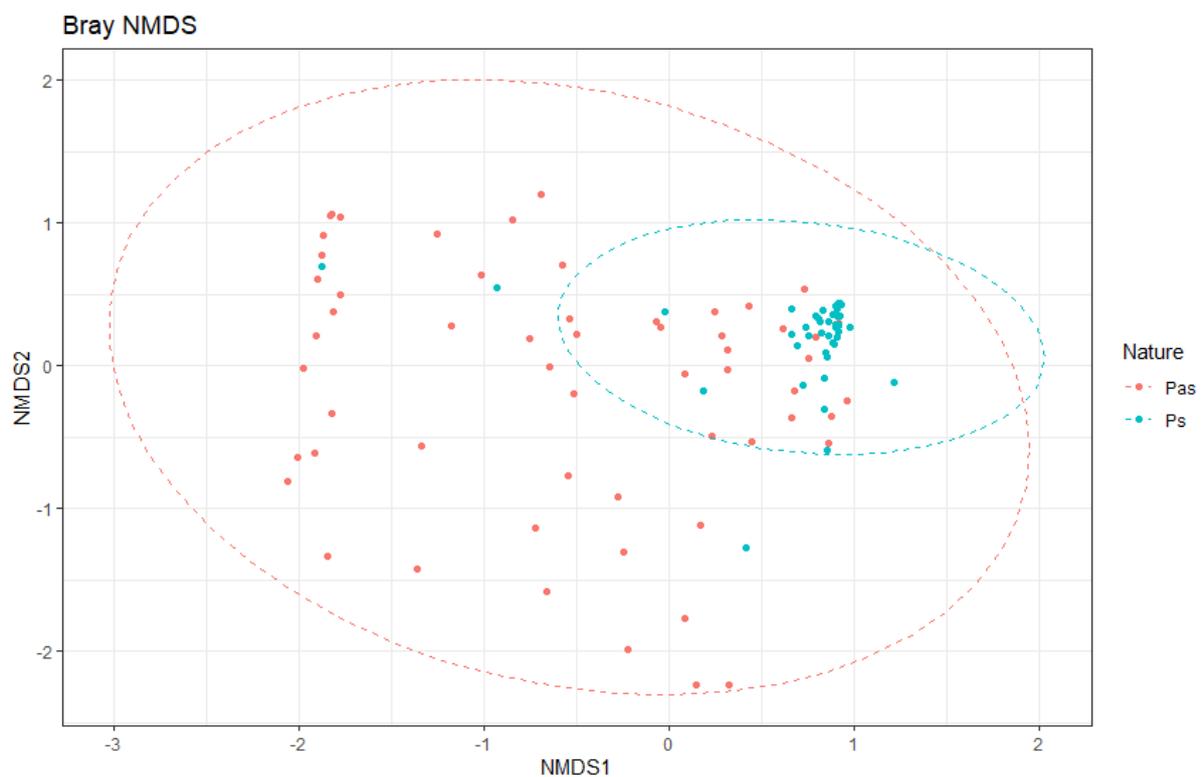


Figure 33 : La distance de Bray-Curtis des échantillons de platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) des épisodes d'infection naturelle de ténacibaculose. Les valeurs d'éloignement des échantillons entre eux sont exprimées en NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). La valeur de stress est de 0,16 et la p-value est de 0,001.

La β -diversité permet d'évaluer la dissimilarité d'abondance de taxons entre deux échantillons. Elle est étudiée à partir de la distance de Bray-Curtis. Cette distance est représentée sur la figure 33 pour les platax asymptomatiques et symptomatiques étudiés lors des épisodes de ténacibaculose naturelle. La valeur de stress de la figure est de 0,16 ce qui est le signe d'une représentation en deux dimensions moyennement fiable par rapport aux valeurs obtenues.

On observe que la composition microbienne des différents frottis de platax symptomatiques est relativement similaire tandis qu'il existe de fortes dissemblances entre les microbiotes tégumentaires des platax asymptomatiques. Les deux groupes sont significativement différents (p-value de 0,001). Cette observation est cohérente avec les résultats de l'équipe de Le Luyer portant sur le métabarcoding de platax en condition d'infection expérimentale de ténacibaculose, qui indiquent des communautés bactériennes moins hétérogènes pour les frottis de poissons 24h après l'infection que pour le groupe contrôle (Le Luyer et al. 2020).

Ainsi, le microbiote tégumentaire des platax symptomatiques est significativement plus pauvre en diversité de microorganismes que les platax asymptomatiques mais il présente également très peu de variabilités selon l'échantillon considéré. Les platax asymptomatiques forment quant à eux, un groupe plus hétérogène mais aussi plus diversifié. Il est probable que la richesse et la diversité des microbiotes des platax asymptomatiques soient le fait des différents sites étudiés. On observe en effet des genres bactériens différents pour les platax asymptomatiques des sites de Taha'a et de Toahotu sur la figure 31. Il reste à établir, si au sein de chacun des sites, ces échantillons de platax asymptomatiques présentent une richesse microbienne similaire et s'ils forment des groupes homogènes ou hétérogènes.

- Une influence du site de prélèvement sur la composition du microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques

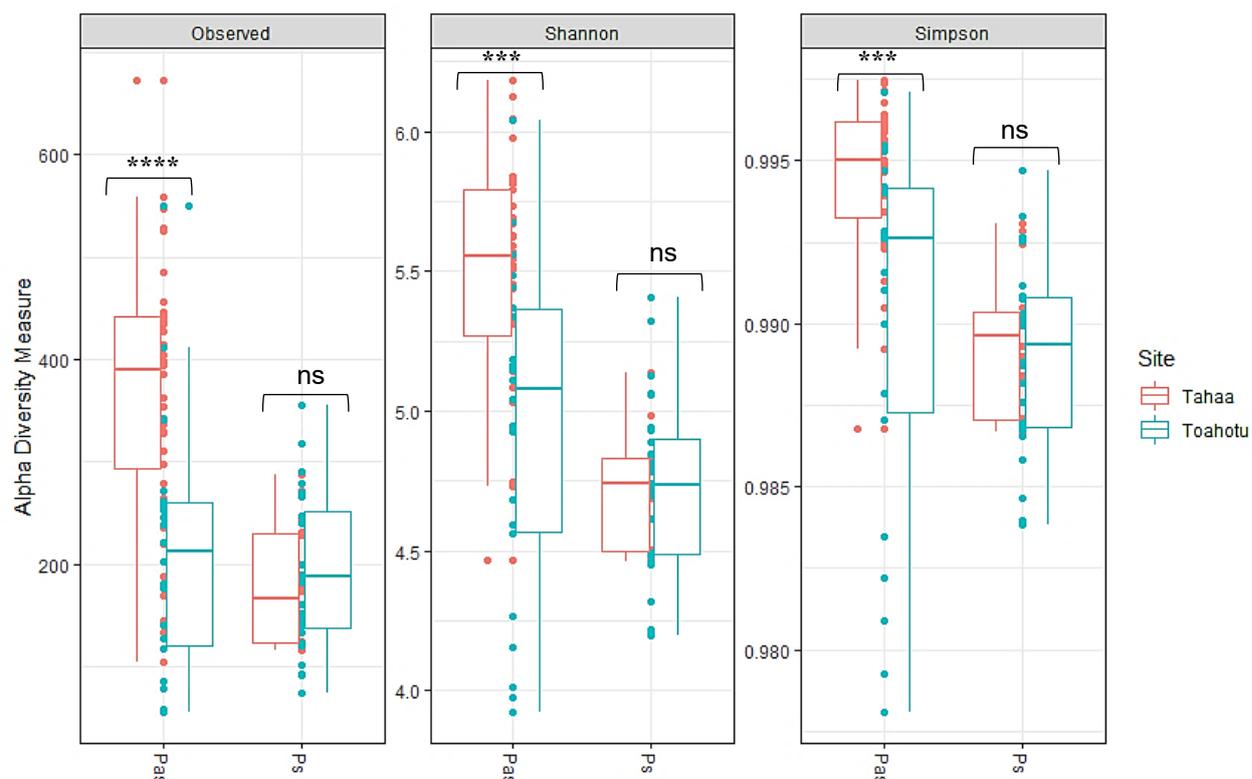


Figure 34 : Les indices d' α -diversité des platax asymptomatiques (Pas) et symptomatiques (Ps) des sites de Taha'a et de Toahotu. Les symboles « **** », « *** » et « ns » indiquent respectivement une p-value < 0.0001 , < 0.001 et > 0.05 .

On observe que la richesse en microorganismes des échantillons de platax asymptomatiques, prélevés lors des épisodes naturels de ténacibaculose, est statistiquement différente selon le site concerné (Figure 34). On rappelle que les poissons n'avaient pas le même âge ni le même poids selon le site de prélèvement. Les poissons asymptomatiques présentent dans leur globalité une composition en microorganismes qui est plus riche et homogène pour un même échantillon sur le site de Taha'a que sur la ferme de Toahotu. L'étude de la β -diversité permettrait de comparer les échantillons de platax asymptomatiques entre eux en observant distinctement les échantillons des deux sites de prélèvements.

Autrefois, la figure 34 confirme que les échantillons de platax symptomatiques forment un groupe d'échantillon plus homogène et que leurs indices d' α -diversité sont similaires quel que soit le site de prélèvement.

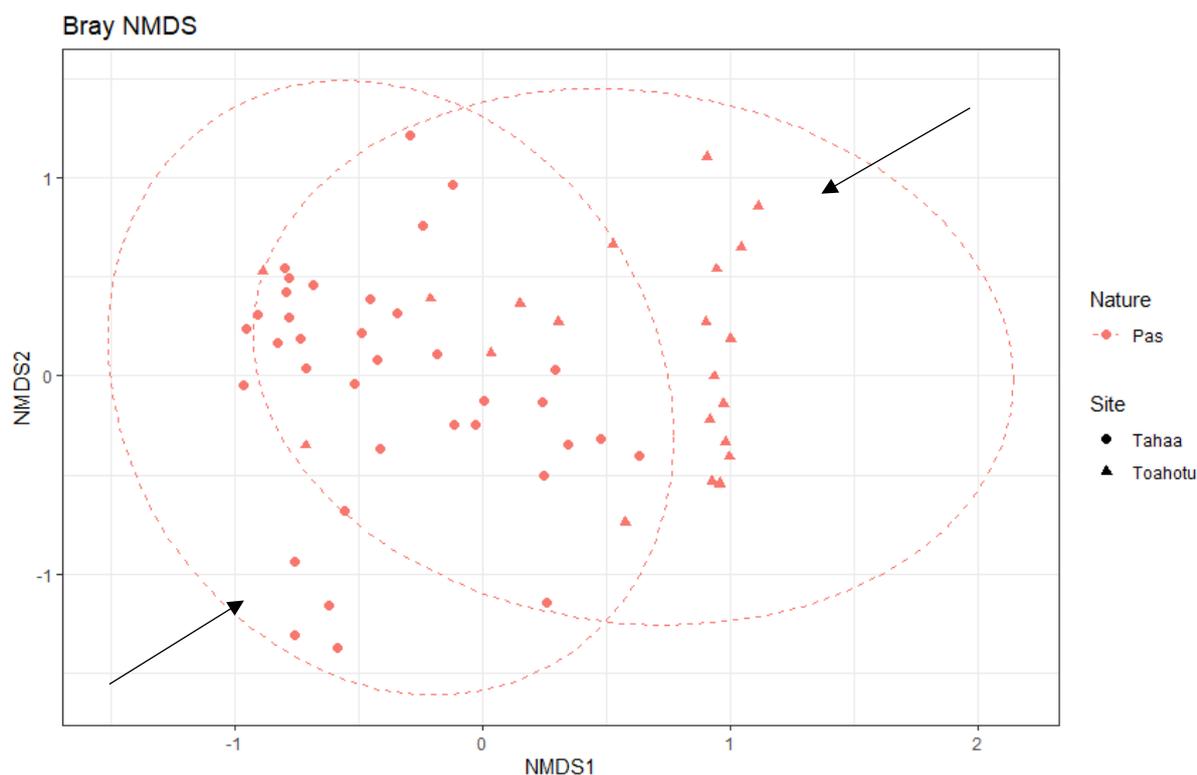


Figure 35 : La distance de Bray-Curtis des échantillons de platax asymptomatiques sur les sites de Taha'a et de Toahotu. Les échantillons les plus éloignés sont mis en évidence par les flèches noires (→). Les valeurs d'éloignement des échantillons entre eux sont exprimées en NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). La valeur de stress est de 0,19 et la p-value est de 0,001.

La β -diversité, évaluée à partir de la distance de Bray-Curtis, présente la dissimilarité d'abondance de taxons entre les échantillons de platax asymptomatiques des deux sites. Les échantillons de platax asymptomatiques représentés sont au nombre de 58 avec 36 poissons prélevés sur le site de Taha'a et 22 sur le site de Toahotu. La p-value est de 0,001 ce qui indique une différence significative. La valeur de stress de la représentation graphique est de 0,19 ce qui indique une représentation graphique peu fidèle aux valeurs obtenues.

On observe sur la figure 35, que les échantillons présentant des microbiotes tégumentaires les plus éloignés ont été prélevés dans des sites d'élevage distincts. Ils sont mis en évidence par les flèches noires. Le site de Taha'a regroupe des échantillons de platax asymptomatiques qui paraissent légèrement plus similaires en termes d'abondance de taxons microbiens que le site de Toahotu d'après la représentation. Cependant compte tenu de la valeur de stress qui qualifie la figure de douteuse, il n'est pas possible de conclure à une plus grande homogénéité des échantillons sur le site de Taha'a à partir de la représentation graphique. Toutefois, la p-value d'une valeur de 0,001 permet de conclure qu'il y a une dissimilarité significative entre les microbiotes des platax asymptomatiques des deux sites.

Les platax asymptomatiques échantillonnés sur le site de Taha'a possèdent donc des microbiotes plus riches et homogènes en diversité microbienne mais ils sont aussi plus similaires entre les échantillons considérés que ceux des poissons asymptomatiques de Toahotu. L'analyse statistique des prélèvements de bio-encrassement pourrait nous indiquer si ces distinctions de diversité, pour les platax asymptomatiques selon les sites d'élevage, se retrouvent dans l'environnement des poissons au niveau des structures d'élevage.

- L'analyse statistique des prélèvements de bio-encrassement des structures de chaque site d'élevage

La représentation de l'abondance des taxons majoritaires des échantillons (Figure 31) a permis d'observer une composition très différente entre les microbiotes portés par les structures d'élevage des deux sites. A Taha'a, le bio-encrassement est constitué très majoritairement de cyanobactéries filamenteuses appartenant au genre planctonique *Cylindrospermopsis CRJI* et à Toahotu des protéobactéries des genres *Esherichia*, *Shigella* et des firmicutes du genre *Staphylococcus*.

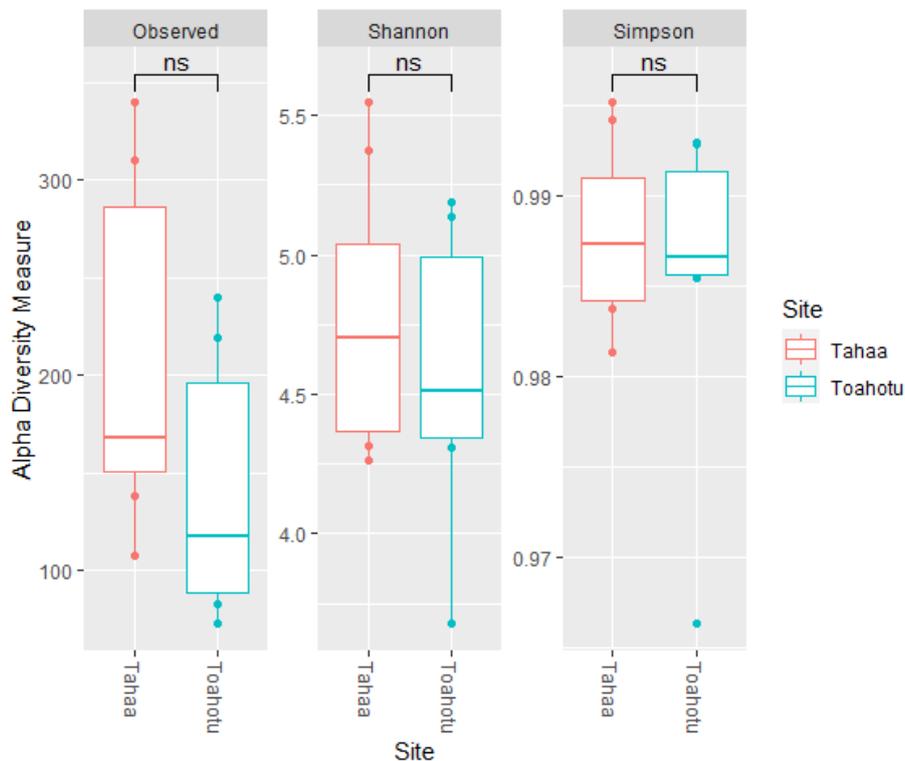


Figure 36 : Les indices d' α -diversité des prélèvements de bio-encrassement des structures d'élevage des sites de Taha'a et de Toahotu. L'abréviation « ns » signifie que les différences observées ne sont pas significatives (p -value > 0.05)

L'analyse de l' α -diversité des échantillons de bio-encrassement révèle une tendance opposée aux observations de la figure 31. On trouve en effet deux à trois taxons majoritaires dans les échantillons de bio-encrassement de Toahotu considérés individuellement alors que ceux de Taha'a ne contiennent qu'un taxon parfois très abondant. Néanmoins, pour plusieurs échantillons du site de Taha'a, l'abondance des taxons majoritaires représentés est parfois très faible et la composition du microbiote de ces échantillons n'est pas représentée. Dans ces cas là, ils sont probablement constitués de plusieurs taxons minoritaires et ainsi riches de nombreuses espèces de microorganismes différents.

Les indices d' α -diversité s'avèrent être relativement équivalents pour les échantillons des deux sites avec une tendance légèrement plus élevée pour des échantillons du site de Taha'a (Figure 36). Il apparaît donc que la richesse du microbiote et son homogénéité pour chaque échantillon ne sont pas significativement différents selon les sites et auraient même tendance à être légèrement supérieurs pour les échantillons du site de Taha'a, bien que ce ne soit pas significatif.

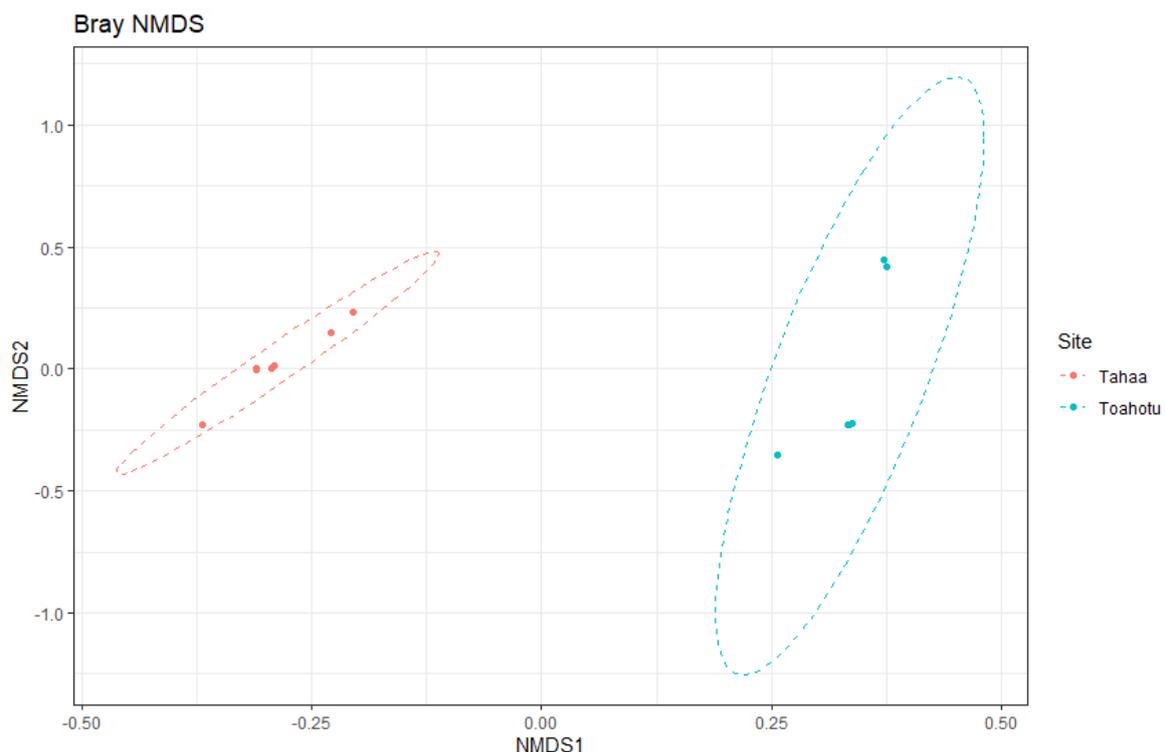


Figure 37 : La distance de Bray-Curtis entre les échantillons de bio-encrassements prélevés sur les structures d'élevage des fermes de Taha'a et de Toahotu. Les valeurs d'éloignement des échantillons entre eux sont exprimées en NMDS (*non-metric multidimensional scaling*). La valeur de stress est de 0,07 et la p-value est de 0,002.

Comme attendu, l'analyse de la β -diversité des échantillons de bio-encrassement (Figure 37) confirme qu'il existe une différence significative (p-value de 0,002) entre les prélèvements de bio-encrassement des deux sites. Cette différence est bien visible sur la représentation graphique qui est fidèle aux valeurs. En effet la valeur de stress de 0.07 est le signe d'une représentation plutôt fiable. La composition en microorganismes est plus variable pour les échantillons de bio-encrassement du site de Toahotu car l'ellipse construite à partir de ces échantillons est plus dispersée et de plus grande taille.

d) L'étude comparative des échantillons séquencés sur les régions V4 et V1-V2 de l'ADN ribosomique 16S

Dix-neuf prélèvements de la campagne d'échantillonnage ont été séquencés sur deux régions distinctes de l'ADN ribosomique 16S V4 et V1-V2, dont trois n'ont pas pu être séquencés correctement. L'objectif était d'obtenir une assignation taxonomique plus précise (au rang de l'espèce idéalement) à partir de la région V1-V2, étant donné que pour un certain nombre de souches du genre *Tenacibaculum*, cette région présente une plus grande variabilité (annexes 1 et 2). Cependant aucune assignation taxonomique n'a pu être obtenue au rang de l'espèce pour les échantillons séquencés sur la région V1-V2 et seules cinq espèces (dont *Tenacibaculum maritimum*) ont été identifiées sur l'ensemble des échantillons séquencés sur la région V4. Il est en revanche intéressant d'observer si les assignations taxonomiques obtenues pour les mêmes échantillons sont similaires.

Les résultats représentés sont obtenus à partir des 300 taxons majoritaires (sur les 13712 considérés pour tous les échantillons) quelle que soit la région séquencée. L'abondance des taxons identifiés dans les 16 échantillons, est représentée à la précision de la famille et du genre. Les échantillons sont ordonnés selon le site de prélèvement (l'écloserie VAIA et le site de Toahotu), puis selon la nature de l'échantillon à savoir les platax asymptomatiques puis les platax symptomatiques.

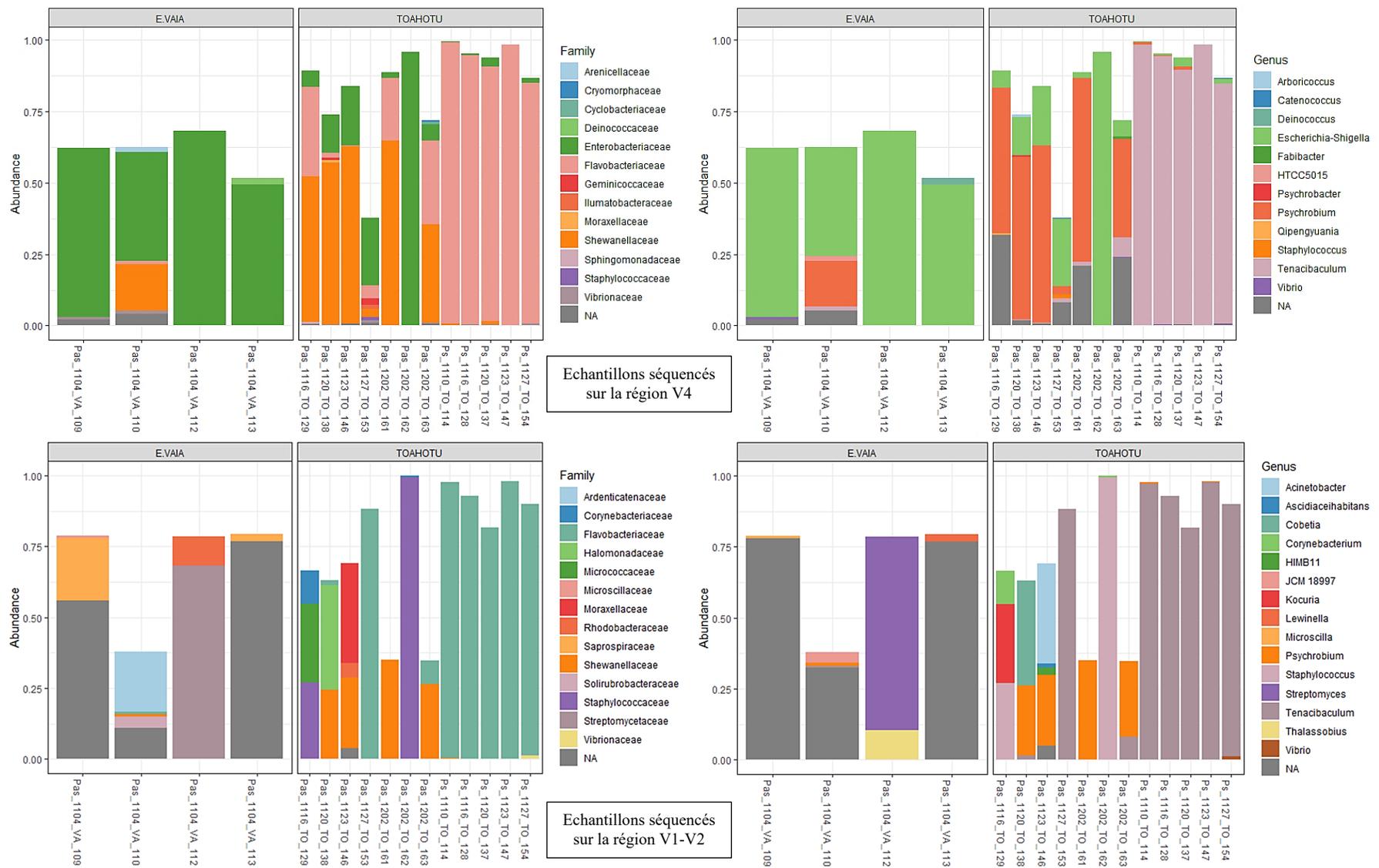


Figure 38 : Présentation de l'abondance des principaux taxons dans les échantillons séquencés sur les régions V4 et V1-V2 à la précision de la famille et du genre.

On constate qu'en fonction de la région séquencée, l'assignation taxonomique est relativement différente (Figure 38). En effet, seules les familles des *Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae* et *Vibrionaceae* sont retrouvées pour les deux régions de l'ADN 16S étudiées. Les genres *Tenacibaculum*, *Staphylococcus* et *Vibrio* sont les seuls à être également présents sur les graphiques des deux régions. Les abondances des taxons de la famille des *Flavobactéries* et du genre *Tenacibaculum* sont relativement similaires entre des régions étudiées (hormis pour l'échantillon Pas_1127_TO_153). En revanche, les abondances du genre *Staphylococcus* ne sont pas similaires entre les graphiques des régions V4 et V1-V2. Tous les autres taxons identifiés au rang de la famille et du genre sont dissemblables et n'ont donc pas été retrouvés parmi les 300 taxons majoritaires pour les deux régions. La cohérence des différents taxons identifiés pour les deux régions séquencées a été vérifiée, ils sont bien retrouvés dans l'eau de mer, les sédiments ou à partir d'organismes marins.

Il a également été vérifié que le nombre de séquences obtenu à l'issue du traitement bio-informatique pour les régions V1-V2 et V4 était similaire pour les échantillons concernés. Les échantillons séquencés sur la région V1-V2 présentent en moyennent 26 000 séquences par échantillon (avec un minimum de 2 000 et un maximum de 61 000) et ces mêmes échantillons séquencés sur la région V4 présentent en moyenne 24 000 séquences par échantillon (pour une valeur minimale de 8 000 et une valeur maximale de 80 000). Il apparaît que l'efficacité de la réaction d'amplification, réalisée en amont du séquençage, soit moins bonne pour la région V1-V2 que pour la région V4 mais cela reste négligeable. Une efficacité plus faible peut être expliquée par la taille des séquences V1-V2 (460pb) qui est supérieure à celle de la région V4 (388 pb).

3. Discussion

L'analyse de métabarcoding des frottis tégumentaires des platax en conditions d'infection ainsi que des prélèvements de leur environnement met en évidence une forte abondance de bactéries du genre *Tenacibaculum* dans les échantillons. Dans le cadre de conditions d'élevage similaires, on retrouve un microbiote tégumentaire globalement différent entre les platax symptomatiques et les platax asymptomatiques. Ces derniers présentent une composition du microbiote plus riche et homogène ce qui est mis en évidence par les indices d' α -diversité. Ce profil microbien est également plus éloigné entre deux poissons asymptomatiques qu'au sein des poissons symptomatiques (β -diversité avec la distance de Bray-Curtis). La diversité en microorganisme de chaque échantillon de platax asymptomatique concerne en réalité les poissons du site de Taha'a. Or les poissons n'ayant

pas été transférés dans les deux sites au même poids ni au même âge (1g sur la ferme de Taha'a et 9g sur le site de Toahotu), il n'est pas possible de conclure à une influence du site d'élevage car ces différences peuvent être liées au stade physiologique des platax. Toutefois, cette étude a mis en évidence que les microbiotes présents au sein des cages d'élevage, qui ont été étudiés à partir des prélèvements de bio-encrassement des structures sont très différents entre les deux sites. Ceci est en faveur d'un effet site prédominant à l'effet du stade physiologique pour expliquer les variations de composition du microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques des deux sites.

La dénomination de platax asymptomatique réunit les poissons de la fin de l'élevage larvaire élevés en conditions biosécurisées, ceux échantillonnés sur le site de l'écloserie Vaia en condition non biosécurisée entre 1 g et 9 g avant leur transfert sur la ferme de Toahotu et les deux groupes de les platax échantillonnés au cours des épisodes infectieux des fermes d'élevages de Taha'a puis de Toahotu ne présentant pas de symptômes ni lésions de ténacibaculose. Les conditions d'élevage étant très différentes, les compositions du microbiote tégumentaire de ces différentes catégories de poissons asymptomatiques présentent parfois des différences marquées. Le microbiote tégumentaire des platax de la fin de l'élevage larvaire est probablement conditionné par les microorganismes incorporés dans les bassins lors du dépôt des œufs, par le biais des aliments distribués voire de l'eau de mer dans l'hypothèse d'une défaillance du système de filtration et de stérilisation par rayonnements ultraviolets. Il est composé de taxons relativement différents de ceux des autres catégories de poissons asymptomatiques avec une majorité du genre *Nautella*. Les poissons asymptomatiques du site de l'écloserie Vaia conservés en conditions non biosécurisées présentent quant à eux un microbiote tégumentaire composé de taxons retrouvés sur les poissons des fermes d'élevages notamment les genres *Catenococcus*, *Escherichia-Shiguella*, *Pseudoalteromonas* et *Psychrobium*. Ces micro-organismes semblent alors provenir du milieu d'élevage. L'analyse des prélèvements de bio-encrassement a ainsi pour objectif de déterminer les réservoirs de ces agents et plus particulièrement celui de *Tenacibaculum maritimum*.

Il serait intéressant de repérer si un ou plusieurs taxons sont présents systématiquement, et en abondance relativement importante, sur les poissons asymptomatiques tout en étant absent des prélèvements de poissons symptomatiques car il pourrait peut-être s'agir de microorganismes pouvant avoir des propriétés antimicrobiennes contre les agents de la ténacibaculose. Néanmoins, aucun taxon répondant à ces critères n'a pu être identifié. La famille des *Pseudoalteromonadaceae*, qui réunit de nombreuses espèces

produisant des métabolites d'intérêt ayant des propriétés antibactériennes et antivirales (Ivanova et al. 2014), est identifiée parmi les taxons majoritaires. Toutefois, la présence de ces bactéries apparaît comme irrégulière selon les prélèvements et ne peut être associée à l'absence de signes cliniques des platax asymptomatiques.

De façon similaire, les agents du genre *Vibrio* sont identifiés de façon irrégulière dans le microbiote des poissons symptomatiques comme asymptomatiques ainsi qu'au sein du microbiote de l'élevage larvaire. L'hypothèse d'une co-infection avec l'agent *T. maritimum* au cours d'un épisode d'infection naturelle ne peut être étayée par les résultats de ce travail. L'hypothèse était fondée sur l'observation de cette bactérie lors d'épisode de ténacibaculose en Polynésie (Le Luyer et al. 2020), mais aussi à partir d'analyses de métabarcoding dont celles réalisées par l'équipe scientifique de Wynne en 2020 qui retrouvait une plus grande abondance d'espèces du genre *Vibrio* sur des saumons d'Atlantique symptomatiques que sur les poissons asymptomatiques, au cours d'une infection naturelle de ténacibaculose (syndrome de la pourriture de la bouche) (Wynne et al. 2020). Toutefois, de nombreuses séquences de mauvaise qualité sont éliminées lors du traitement bio-informatique des données pour ne conserver en sortie que 72% des lectures. De plus, s'agissant de la présentation d'une abondance relative des microorganismes d'un même prélèvement, le taxon *Tenacibaculum* pourrait masquer le signal d'autres microorganismes dont ceux appartenant au genre *Vibrio* pour de nombreux échantillons de platax symptomatiques notamment.

La méthode de traitement bio-informatique utilisée pour ce travail est fondée sur l'identification de 13 712 ASV, d'où le choix de ne présenter que les taxons majoritaires (n=800 pour les échantillons présentés avec un séquençage sur la région V4 et n=300 pour la comparaison des régions V4 et V1-V2). Il est possible de procéder différemment en réalisant une étape de « Clustering », permettant de regrouper les séquences uniques présentant un certain pourcentage de similarité (97% généralement). Cela permet de simplifier l'exploitation des données, en donnant plus de poids aux assignations taxonomiques majoritaires. Néanmoins, le « clustering » peut conduire à une perte importante d'informations sur la richesse en micro-organismes des échantillons car des séquences relativement proches (97% de similarités), mais conduisant à des assignations différentes, sont régulièrement assimilées.

Par ailleurs, identifier plus précisément les taxons au rang de l'espèce, permettrait de confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle *T. maritimum* est la seule bactérie du genre *Tenacibaculum* responsable de la ténacibaculose en Polynésie française. La base de données EzBioCloud est décrite comme la base de donnée la plus précise pour obtenir une taxonomie

au rang du genre ou de l'espèce, en comparaison avec les bases Silva et GreenGenes (Park, Won 2018), et pourrait potentiellement permettre d'identifier un plus grand nombre d'espèces dans les échantillons. Malheureusement elle n'a pas pu être exploitée dans le temps imparti pour ce travail.

Le séquençage de quelques échantillons sur la région V1-V2 de l'ADN ribosomique 16S avait pour objectif d'obtenir une assignation au rang de l'espèce plus discriminante pour les bactéries du genre *Tenacibaculum*. Les alignements de séquence présentés en annexe 1 et 2 pour les régions V4 et V1-V2 respectivement de plusieurs souches de *Tenacibaculum*, indiquent effectivement que la région V1-V2 présente plus de variabilité interspécifique. Cependant une assignation à la précision de l'espèce n'a été obtenue pour aucun échantillon séquençé sur la région V1-V2. Lors de la comparaison des résultats obtenus à partir du séquençage des régions V4 et V1-V2 pour les mêmes échantillons, les assignations taxonomiques sont relativement différentes. On rappelle que les échantillons ont été traités conjointement par les outils informatiques et que les échantillons n'ayant pas été amplifiés correctement ont quant à eux été éliminés juste après, en amont de l'exploitation des données ayant été présentées. Il est probable que ces différences proviennent des informations des bases de données utilisées pour l'assignation taxonomique. La région V1-V2 est régulièrement moins bien renseignée que la région V4 sur les bases de données car les amorces utilisées pour le séquençage de l'ARN ribosomique 16S commencent régulièrement après la base 27 de l'extrémité 5' du brin d'ADN. Sur la base de données SILVA NR (non redondant), l'amorce 27F permet d'obtenir uniquement 131 084 appariements tandis que les amorces 357R, 515F et 806R sont retrouvées sur plus de 400 000 séquences. Il y a donc un manque d'informations important pour la région V1-V2 de nombreuses séquences dans les bases de données, à l'image de l'alignement réalisé à partir de souches de *Tenacibaculum maritimum* et présenté en annexe 2.

Enfin, le procédé de métabarcoding permet d'obtenir les abondances relatives des microorganismes entre plusieurs échantillons mais il n'est pas possible de quantifier les agents identifiés, notamment parce que de nombreuses espèces microbiennes possèdent un nombre de copies différentes et parfois variables d'ADN ribosomique 16S. A titre d'exemple, la bactérie *T. maritimum* en contient 6 copies (Pérez-Pascual et al. 2017) et l'espèce *Vibrio harveyi*, soupçonnée d'être un agent opportuniste de co-infection lors de ténacibaculose en contient 12 copies (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP009468.1). De plus, compte tenu des erreurs de séquençage il est nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes afin de

quantifier la pression bactérienne d'un agent infectieux comme les méthodes de PCR quantitative ciblant des régions variables spécifiques du microorganisme.

III. Evaluation d'une co-infection par *Vibrio harveyi* au cours d'un cycle de production de platax infecté par *Tenacibaculum maritimum*

Les bactéries du genre *Vibrio* ont été identifiées à de nombreuses reprises lors d'épisodes symptomatiques de ténacibaculose (Kimura, Kusuda 1983 ; Pepin, Emery 1993 ; Handler et al. 1997 ; Avendaño-Herrera et al. 2006b ; Miyake et al. 2020). Elles ont notamment été détectées à plusieurs reprises lors d'épisodes symptomatiques de ténacibaculose en Polynésie française (Le Luyer et al. 2020).

Vibrio harveyi est un bacille droit à Gram négatif motile grâce à une ciliature. Il est retrouvé chez de nombreuses espèces à travers le monde et fréquemment en co-infection avec des organismes pathogènes. Il est régulièrement isolé dans les organes internes comme le foie ou les intestins. Le tableau clinique et lésionnel associé à une infection par *Vibrio harveyi* est celui d'une septicémie (Austin, Zhang 2006). Il est également retrouvé au centre des lésions cutanées observées lors de ténacibaculose.

Dans le cadre de l'étude du microbiote du *Platax orbicularis*, au cours des épisodes d'infection naturelle de ténacibaculose sur les sites de Taha'a et de Toahotu, les microorganismes appartenant au genre *Vibrio* n'ont pas été identifiés systématiquement sur les platax de l'épisode infectieux. Ils n'ont pas été identifiés plus fréquemment, ni en plus forte abondance sur les platax symptomatiques (Figure 30).

L'identification de *Vibrio harveyi* peut se faire par séquençage de l'ARN ribosomique 16S. Cependant plusieurs espèces du genre *Vibrio* partagent des données génétiques similaires à identiques pour cette séquence d'ADN, ce qui ne permet pas de discriminer avec fiabilité différentes espèces de ce genre dont *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio natriegens* et *Vibrio parahaemolyticus* (Gomez-Gil et al. 2004 ; Thompson et al. 2009). D'autres méthodes ont été développées à partir de séquences variables plus discriminantes de la molécule d'ADN, notamment la PCR quantitative décrite par Schikorski en 2013 ciblant le gène *toxR* qui est utilisé pour ce travail (Schikorski et al. 2013).

1. Matériel et méthodes

a) La méthode de qPCR TaqMan ciblant *Vibrio harveyi*

Les échantillons pour lesquels une quantification de l'agent *Vibrio harveyi* a été réalisée sont présentés dans la seconde partie de ce travail au paragraphe I. Il s'agit des mêmes prélèvements que ceux traités pour l'étude de métabarcoding sur le microbiote tégumentaire et environnemental du cycle de platax soumis à une infection naturelle sur deux sites d'élevage. Cependant sur les 153 échantillons prélevés, 11 d'entre eux ne contenaient pas suffisamment de matériel génétique pour poursuivre les analyses. Un total de 142 échantillons a donc été traité. Les 11 échantillons non traités ne correspondent pas aux 11 échantillons n'ayant pas été présentés dans les données de métabarcoding car l'amplification pré-séquençage n'avait pas été satisfaisante.

Pour cela, la méthode utilisée est la PCR quantitative TaqMan ciblant le gène *toxR*, un gène de référence pour détecter l'espèce *V. harveyi* comme décrite par l'équipe de D. Schikorski en 2013 (Schikorski et al. 2013). Les séquences des amorces sens (forward F) et anti-sens (reverse R) ainsi que la sonde sont ciblées dans des régions variables, spécifiques de l'espèce *V. harveyi* (Tableau 8). Dans le cadre du développement de cette méthode, les données génomiques des bases de données GenBank et EMBL ainsi que le logiciel Primer-3 ont été utilisés pour concevoir les amorces et la sonde de qPCR. La sonde est révélée par le fluorochrome 6-carboxyfluorescéine (FAM).

La qPCR est réalisée sur le thermocycler MXP3000 à l'aide du kit de réactifs de base Brilliant III (Agilent). Chaque réaction est réalisée en duplicat pour un volume final de 20 μ L contenant 5 μ L d'ADN extrait des échantillons dilués à 10ng/ μ L, 10 μ L du réactif Brilliant III, chaque amorce à une concentration finale de 300nM (Forward et Reverse) et la sonde TaqMan à une concentration finale de 200nM ; 1 μ L d'eau de qualité biologie moléculaire est ajouté pour compléter le volume. Le profil thermique utilisé pour cette réaction varie légèrement de la méthode décrite par Schikorski et ses collaborateurs (Schikorski et al. 2013). En effet il est constitué d'un cycle de 3 minutes à 95°C pour l'étape de dénaturation de l'ADN, comme recommandé par le fournisseur du kit de réactifs (Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, ref 600881 Agilent), alors qu'il dure 10 minutes dans la méthode décrite utilisant le Brilliant® qPCR Core Reagent Kit (Stratagene). S'ensuivent 40 cycles identiques de deux étapes : la première de 15 secondes à 95°C et la seconde de 20 secondes à 60°C, pour l'amplification et la quantification en temps réel.

Tableau 8 : Les amorces sens, anti-sens et la sonde de la réaction de PCR permettant de quantifier l'agent *Vibrio harveyi* à partir du gène ToxR

Nom	Fonction	Séquence 5'-3'	Taille de l'amplicon
ToxR F	Amorce sens	CCACTGCTGAGACAAAAGCA	162 pb
ToxR R	Amorce anti-sens	GTGATTCTGCAGGGTTGGTT	
ToxR P	Sonde	CAGCCGTCGAACAAGCACCG	

Le nombre de bactérie *Vibrio harveyi* est calculé à partir de la valeur de Ct du signal de l'échantillon. Il s'agit du nombre de cycles nécessaire pour atteindre une fluorescence supérieure au seuil de référence fixé (informations sur les données de qPCR en annexe 5). Pour cela il faut connaître les paramètres de l'efficacité de la réaction. Les données du calcul de l'efficacité sont présentées dans le tableau 9. La gamme de *Vibrio harveyi* pouvant être quantifiée est exprimée en nombre de copie du gène *toxR* ciblé. En effet une seule bactérie *Vibrio harveyi* contient une seule copie du gène *ToxR*, pour une taille de génome de la souche utilisée (LMG4044 T) de 5 758 394 paires de bases.

Tableau 9 : Les paramètres obtenus lors de la mesure de l'efficacité de la réaction de qPCR ciblant *Vibrio harveyi* avec la souche LMG 4044. Les paramètres a et b correspondent respectivement à la pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe standard et R² au coefficient de détermination.

Efficacité	a	b	R ²	Gamme quantifiable	Valeurs de Ct délimitant la gamme	Souche de référence utilisée
97.4%	-3.386	42.38	0.999	10 ² – 10 ⁸ copies	[35.75 -15.38]	LMG 4044

b) La méthode de qPCR TaqMan ciblant *Tenacibaculum maritimum*

La quantification de *Tenacibaculum maritimum* a été réalisée en amont de ce travail de thèse par Déborah DELNESSE, étudiante CREUFOP et ancienne stagiaire du centre IFREMER du Pacifique.

La méthode de qPCR utilisée dans cette étude a été développée par P. Lopez dans le cadre de sa thèse universitaire et fera l'objet d'une publication scientifique. Contrairement aux autres méthodes de PCR qui ont été développées afin d'identifier ou diagnostiquer *T. maritimum* jusqu'à présent (Fringuelli et al. 2012 ; Nowlan 2020 ; Fernández-Álvarez et al.

2019 ; Bader, Shotts 1998) ; cette technique ne cible pas le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. En effet, certains auteurs (Suzuki et al. 2001 ; Frisch et al. 2018b) pointent du doigt le faible degré de polymorphisme spécifique de l'espèce *T. maritimum* dans ce gène (annexes 1 et 2). D'autre part ce gène est présent en plusieurs copies et on retrouve parfois du polymorphisme entre les différentes copies du 16S.

La méthode utilisée ici, cible un gène (MARIT_1720), codant pour une protéine exportée de fonction inconnue, présent en une seule copie et qui est retrouvé dans tous les génomes de *T. maritimum*. Contrairement au gène codant l'ARN 16S, le gène cible n'est retrouvé dans aucune autre espèce décrite à ce jour ce qui limite les risques de faux positifs (la spécificité des amorces étant de ce fait fournie de par la séquence des amorces mais également de la sonde utilisée).

Le protocole de la PCR quantitative P. Lopez met en jeu les amorces sens (qPCR2 F), anti-sens (qPCR2 R) et la sonde (Probe2) présentées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Les amorces sens, anti-sens et la sonde de la réaction de PCR permettant de quantifier l'agent *Tenacibaculum maritimum* à partir du gène MARIT_1720

Nom	Fonction	Séquence 5'-3'
qPCR2 F	Amorce sens	GTATTTTTCCTTACATCCGTACAC
qPCR2 R	Amorce anti-sens	CCATCATAGGTTTGAACAGTTCC
Probe2	Sonde	6FAM 5'-CTTACTGTATGTGTTCCAAAGTTAATATCGC-3 Tamra'

Les réactifs de la réaction sont présentés dans le tableau 11 :

Tableau 11 : Les réactifs de la réaction de PCR quantitative ciblant *Tenacibaculum maritimum* sur le gène MARIT_1720 et développée par Pierre LOPEZ

Quantité	Réactifs	Concentration final
10µL	Brillant III Master Mix	
0.75µL	Amorce qPCR2F (8µM*)	300nM*
0.75µL	Amorce qPCR2R (8µM*)	300nM*
0.5 µL	Sonde Probe2 (8µM*)	200nM*
3µL	Eau de qualité biologie moléculaire	
5µL	Matrice (échantillon)	

* L'unité « M » signifie molaire ou mole par litre (mol/L). Ainsi 1 nM = 1 nmol/L et 1µM = 1µmol/L.

Le profil thermique de la réaction se compose d'un cycle de 3 minutes à 95°C puis de 40 cycles successifs constitués d'une étape de 15 secondes à 95°C puis de 30 secondes à 57°C. Le fluorochrome de la réaction à renseigner sur le thermocycleur pour la lecture des résultats est FAM.

Les paramètres de la courbe standard obtenue permettant de définir l'efficacité de la réaction (95,5%) sont présentés dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Les paramètres obtenus lors de la mesure de l'efficacité de la réaction de qPCR ciblant *T. maritimum* avec la souche NCIMB2154^T. Les paramètres a et b correspondent respectivement à la pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe standard et R² au coefficient de détermination.

Efficacité	a	b	R ²	Gamme quantifiable	Valeurs de Ct délimitant la gamme	Souche de référence utilisée
95.5%	-3.435	41.29	1.000	1,35.10 ¹ – 1,35.10 ⁷ copies	[37.47 -16.93]	NCIMB 2154 ^T

2. Résultats

Les résultats de la quantification de *Vibrio harveyi*, sont présentés pour chaque échantillon dans la figure 39. Ils sont exprimés en nombre de bactéries *V. harveyi*/µg d'ADN extrait. La figure se compose de deux graphiques distincts, le premier présentant les prélèvements de l'élevage larvaire puis du site de Taha'a, et le second les données des poissons entre 1g et 9g conservés sur le site de Vaia dans des bassins extérieurs non-biosécurisés dans l'attente de leur transfert sur la ferme de Toahotu, puis les échantillons du site de Toahotu. Les prélèvements sont organisés dans l'ordre chronologique puis, pour une même date, on trouve dans l'ordre les échantillons de bio-encrassement, d'eau, des platax de l'élevage larvaire, des platax asymptomatiques puis des platax symptomatiques. La signification de la nomenclature des échantillons est présentée dans la seconde partie de ce travail au paragraphe I.1), par la figure 19.

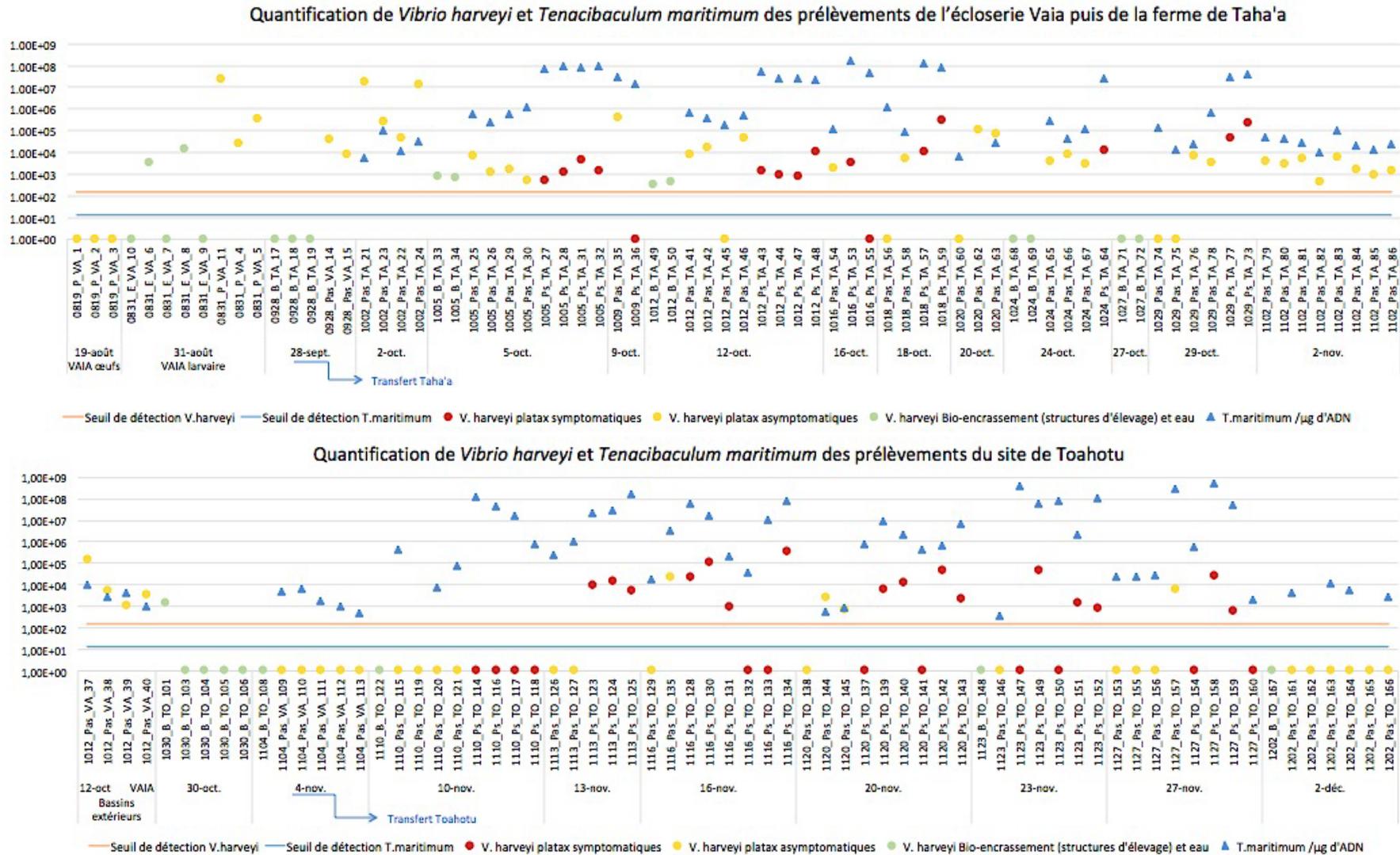


Figure 39 : Quantification de *Vibrio harveyi* et *Tenacibaculum maritimum* des échantillons d'un cycle de platax soumis à une infection naturelle sur les fermes de Taha'a et Toahotu. Les valeurs sont exprimées en nombre de bactéries *V. harveyi*/ μ g d'ADN.

Les échantillons négatifs (no Ct) sont fixés à la valeur de 1,00+00 *V.harveyi*/ μ g d'ADN. Les prélèvements pour lesquels la quantification de *T. maritimum* n'est pas représentée sont négatifs. La quantification de *Tenacibaculum maritimum* a été réalisée en amont de ce travail de thèse par Déborah DELNESSE, étudiante CREUFOP et ancienne stagiaire du centre IFREMER du Pacifique.

On observe que la quantité de *Vibrio harveyi* détectée dans les échantillons varie de 0 à environ 10^7 UFC/ μg d'ADN. Pour 18 des 25 prélèvements de bio-encrassement *Vibrio harveyi* n'est pas détecté par la méthode (72%), sachant que pour 10 de ces échantillons la présence d'inhibiteurs de la polymérase a été détectée. Les 7 prélèvements positifs contiennent quant à eux environ 10^3 *V. harveyi*/ μg d'ADN. Par ailleurs, on retrouve la bactérie *Vibrio harveyi* sur un plus grand nombre d'échantillons prélevés sur le site de Taha'a que sur le site de Toahotu. En effet pour les 61 échantillons prélevés sur le site de Taha'a uniquement (sans considérer les échantillons de début de cycle prélevés à l'écloserie Vaia et présentés sur le même graphique), 47 d'entre eux sont positifs (77%) et tous présentent un signal supérieur au seuil de la méthode ($1.5 \cdot 10^2$ *V. harveyi*/ μg d'ADN), donc quantifiables. A Toahotu sur 59 prélèvements, seuls 20 échantillons (34%) sont positifs et tous présentent également un signal supérieur au seuil. Pour le site de l'écloserie Vaia 7 échantillons de l'élevage larvaire en conditions biosécurisées et 5 prélèvements réalisés en bassins extérieurs non bio-sécurisés donnent un signal positif. La quantité de bactérie *Vibrio harveyi* retrouvée sur les échantillons ne semble pas avoir de lien avec le caractère symptomatique des poissons. *A contrario*, la charge en bactérie *Vibrio harveyi* semble plus importante sur les platax asymptomatique ($8 \cdot 10^5$ *V.harveyi*/ μg d'ADN en moyenne, écart-type de $4 \cdot 10^6$ *V.harveyi*/ μg d'ADN) que les poissons symptomatiques ($3 \cdot 10^4$ *V.harveyi*/ μg d'ADN en moyenne, écart-type de $8,5 \cdot 10^4$ *V.harveyi*/ μg d'ADN) pour les prélèvements des deux fermes d'élevage.

On observe en revanche que le caractère asymptomatique ou symptomatique des platax échantillonnés est très cohérent avec la quantité de bactéries *Tenacibaculum maritimum* retrouvées dans l'échantillon (en nombre de bactéries/ μg d'ADN). Sur le site de Taha'a, la totalité des platax symptomatiques portent une charge bactérienne en *Tenacibaculum maritimum* supérieure à 10^7 bactéries/ μg d'ADN et seul un poisson asymptomatique atteint cette charge bactérienne (1009_Pas_TA_35). Pour les échantillons du site de Toahotu, cette correspondance entre la symptomatologie des poissons et la charge bactérienne apparaît moins systématiquement. L'ensemble des poissons symptomatiques présente une quantité en *T. maritimum* supérieure à 10^5 bactéries/ μg d'ADN, hormis l'échantillon 1116_Ps_TO_132 ($4 \cdot 10^4$ bactéries/ μg d'ADN) et 1127_Ps_TO_160 ($2 \cdot 10^3$ bactéries/ μg d'ADN) mais cinq platax asymptomatiques ont également une charge bactérienne supérieure à 10^5 bactéries/ μg d'ADN. Les échantillons prélevés à l'écloserie Vaia présentant des résultats positifs pour *T. maritimum* concernent des poissons élevés en conditions non-biosécurisée (9/9 poissons positifs), cela ne remet donc pas en compte le procédé de filtration et désinfection de l'eau de mer de l'écloserie. En revanche, cette

information est essentielle pour la compréhension de l'origine de *Tenacibaculum maritimum* et des différents sérotypes de la bactérie impliqués dans l'épisode infectieux de ténacibaculose de la ferme de Toahotu.

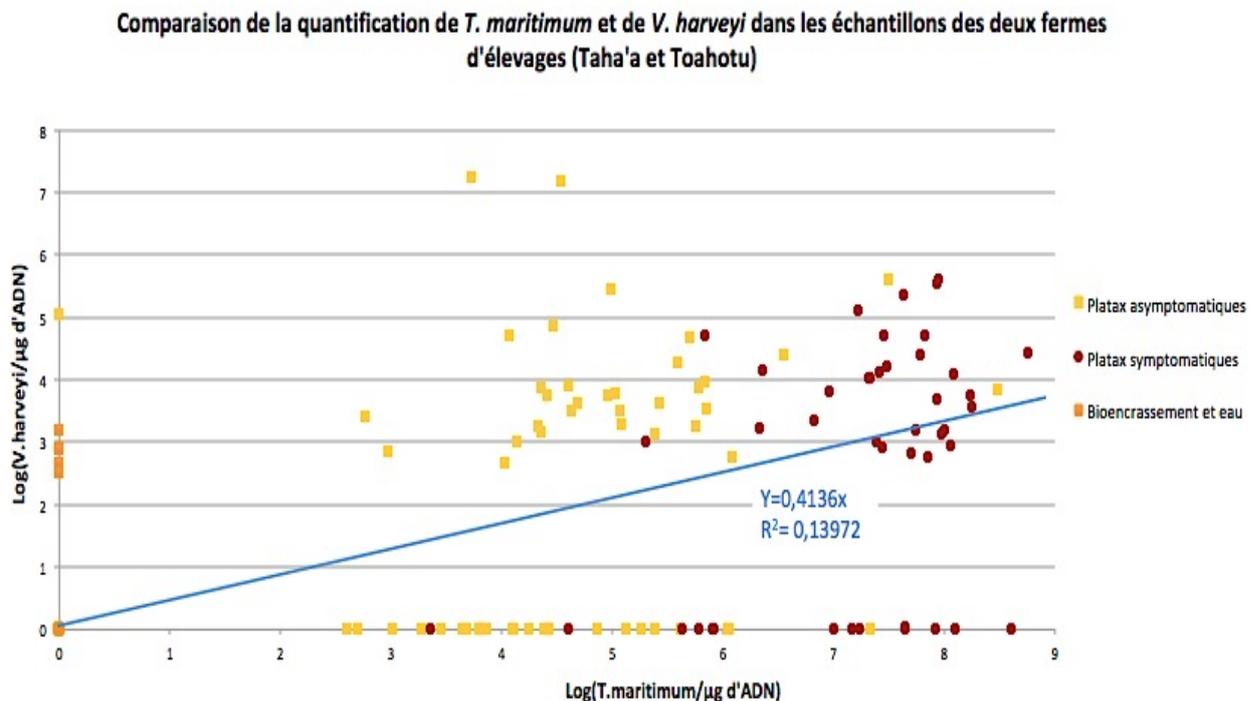


Figure 40 : Comparaison de la quantification de *Tenacibaculum maritimum* et *Vibrio harveyi* par qPCR dans les échantillons des élevages de Taha'a et de Toahotu.

La quantification de *Vibrio harveyi* n'est pas corrélée avec celle de *Tenacibaculum maritimum* dans les prélèvements des deux fermes d'élevage (Figure 40). Le coefficient de corrélation (R^2) obtenu pour la comparaison des quantifications des deux agents bactériens indique une valeur très éloignée de 1. La quantification de *V. harveyi* n'étant pas associée à la quantité de *Tenacibaculum maritimum* des échantillons, l'hypothèse selon laquelle *Vibrio harveyi* serait une bactérie présente en co-infection lors d'épisode de ténacibaculose en milieu naturel n'est pas étayée par nos résultats.

3. Discussion

Tout d'abord, l'agent *Vibrio harveyi* est retrouvé sur trois des prélèvements effectués en zone biosécurisée au sein de l'écloserie Vaia. Cette observation laisse supposer qu'il peut s'agir d'un agent bactérien faisant partie intégrante de la flore bactérienne du platax. Le fait de retrouver cette bactérie en quantité importante indifféremment sur des platax

symptomatiques et asymptomatiques renforce cette hypothèse. De plus, dans le cadre d'infections expérimentales au sein du centre IFREMER du Pacifique, aucune lésion ni mortalité n'ont été obtenues lors de l'infection de platax par des souches *Vibrio harveyi* isolées depuis des prélèvements faits sur des poissons moribonds souffrant de ténacibaculose (données non publiées). Toutefois, il est possible que seules certaines souches de la bactérie possèdent des gènes de virulence, or les tests moléculaires utilisés ciblent uniquement un gène d'intérêt taxonomique (toxR) pour identifier l'espèce *V. harveyi*.

En revanche, les résultats indiquent que la symptomatologie des poissons apparaît fortement associée à la charge bactérienne de *Tenacibaculum maritimum* présente au niveau tégumentaire. Par ailleurs, les analyses de métabarcoding présentées dans la seconde partie de ce travail au paragraphe II, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de taxons bactériens présents systématiquement sur le tégument de poissons symptomatiques, autres que ceux du genre *Tenacibaculum*. En outre, les bactéries du genre *Tenacibaculum*, et plus particulièrement l'espèce *T. maritimum*, apparaissent comme les seuls pathogènes à l'origine des symptômes et lésions de ténacibaculose au cours des épisodes d'infection naturelle dans les deux fermes d'élevage. De plus, la mise en culture des prélèvements sur milieu sélectif Marine Agar (composition du milieu confidentielle) n'a permis de révéler la présence d'aucune autre espèce pathogène appartenant au genre *Tenacibaculum*. Il est tout de même possible que des agents infectieux (bactéries, virus, parasites) colonisant d'autres organes du poisson (organes internes notamment), soient responsables des symptômes et de la mortalité de ces épisodes infectieux. Dans ce cas, la méthode de prélèvements par frottis cutané ne permettrait pas de les détecter.

Autrement, la cohérence des résultats de la PCR quantitative a été évaluée avec ceux du métabarcoding présentés au paragraphe II de la seconde partie de ce document. En effet, une quantification importante de *T. maritimum* pour un échantillon devrait être associée à une abondance élevée du taxon *Tenacibaculum* par métabarcoding (par défaut obtenue à l'échelle du genre et non de l'espèce dans notre étude). L'abondance étant une donnée relative et la quantification une donnée absolue, il s'agit d'évaluer une tendance plus que de réaliser une comparaison rigoureuse des deux méthodes. Il faut considérer que l'espèce quantifiée doit être comprise dans l'abondance du taxon au niveau du genre mais que d'autres espèces du même genre peuvent être présentes et sont donc susceptibles d'augmenter l'abondance du genre. Cette évaluation comparative est représentée par la figure 39. Les données relatives à *Tenacibaculum maritimum* et *Vibrio harveyi* sont présentées conjointement. Seuls les

échantillons pour lesquels une donnée de PCR quantitative et une donnée d'abondance en métabarcoding sont disponibles, pour l'un ou les deux taxons, sont représentés.

La quantification de *T. maritimum* a une tendance relativement bien corrélée avec l'abondance du taxon *Tenacibaculum* pour le même échantillon. Cela laisse supposer que *T. maritimum* est vraisemblablement l'espèce majoritaire du genre *Tenacibaculum* pour l'ensemble des échantillons voire la seule espèce présente. La quantification de *Vibrio harveyi* apparaît bien moins corrélée à l'abondance du taxon du genre *Vibrio*. Plusieurs échantillons présentent une abondance de *Vibrio* relativement élevée pour une quantification de *V. harveyi* faible à nulle (prélèvements de l'élevage larvaire à Vaia), ce qui peut suggérer la présence d'autres espèces du genre *Vibrio* dans les échantillons. Pour cela il serait d'autant plus intéressant d'obtenir une taxonomie à la précision du niveau de l'espèce dans le cadre des analyses de métabarcoding. En revanche, de très nombreux prélèvements contiennent une quantité de *V. harveyi* conséquente alors que l'abondance du taxon est faible à nulle, on peut supposer que de nombreux autres microorganismes sont présents dans les échantillons, d'où une faible abondance relative malgré une forte concentration en *V. harveyi* dans les prélèvements. Il ne s'agit toutefois pas forcément d'échantillons contenant le taxon *Tenacibaculum* en très forte abondance, les prélèvements 0928_Pas_VA_14 et 15 ou 116_Ps_TO_12 et 125 en sont quelques exemples. Par ailleurs, le processus de filtration des données de métabarcoding induisant une perte de près de la moitié des séquences amplifiées, cela peut expliquer la perte d'information qui aurait plus de conséquences sur les taxons faiblement représentés comme *Vibrio*, que sur les taxons majoritaires comme *Tenacibaculum*.

En outre, pour les analyses de métabarcoding et de PCR quantitative, le genre *Tenacibaculum* est très peu observé dans les échantillons d'eau de mer et de bioencrassement. De la même manière, *Tenacibaculum maritimum* n'est globalement pas quantifié dans ces prélèvements. Ainsi, malgré la capacité de la bactérie à former des biofilms, il semble peu probable que les structures prélevées constituent un réservoir du pathogène. Cette observation, qui vient à l'encontre de l'hypothèse formulée par Levipan et ses collaborateurs qui suggère que les structures inertes utilisées en aquaculture peuvent servir de réservoir transitoire pour *T. maritimum* (Levipan et al. 2019), est toutefois à nuancer compte tenu du faible nombre d'échantillons d'eau et de bioencrassement analysés (25), d'autant plus que pour 10 de ces prélèvements la présence d'inhibiteurs de la polymérase a été détectée.

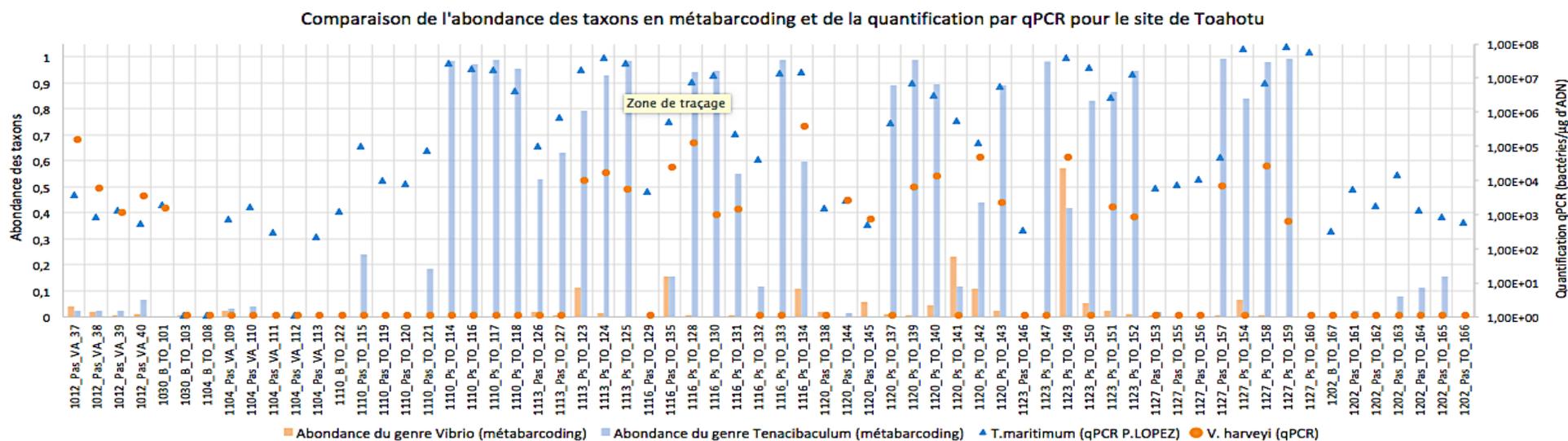
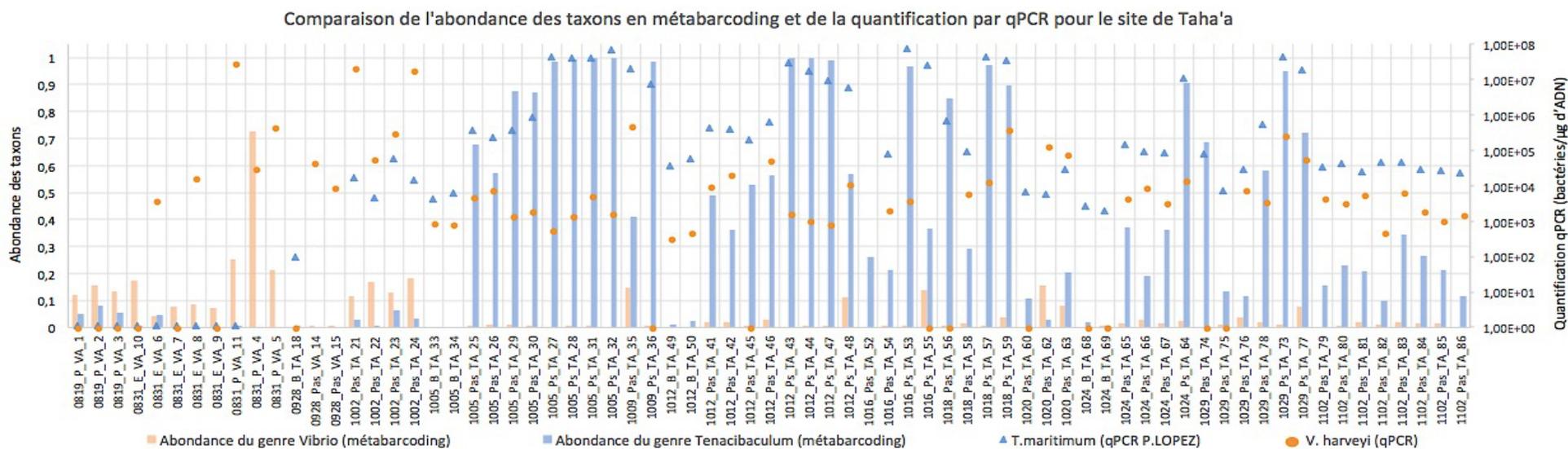


Figure 41 : Comparaison des données de métabarcoding (Abondance des taxons *Tenacibaculum* et *Vibrio*) et des résultats de PCR quantitative (*T. maritimum* et *V. harveyi* en bactéries/ μ g d'ADN).

- IV. Mise au point d'une méthode de PCR quantitative de sérotypage de l'agent *Tenacibaculum maritimum* et application à un cycle de production de *Platax orbicularis* en condition d'infection naturelle au sein de deux fermes d'élevage.

CONTEXTE DE L'ETUDE

Les méthodes de sérologie conventionnelles ont mis en évidence une hétérogénéité au sein de l'espèce *Tenacibaculum maritimum* caractérisée par une variabilité de l'antigène O avec 4 sérotypes identifiés (Avendaño-Herrera et al. 2004a ; Avendaño-Herrera, Magarinos, et al. 2005).

L'identification et la quantification des sérotypes de *T. maritimum* présents lors d'un épisode infectieux en Polynésie française sont des étapes indispensables pour caractériser les souches de *T. maritimum* présentes localement. Cela permet de connaître l'incidence des différents sérotypes au cours d'une infection dans les fermes d'élevage afin d'envisager l'élaboration d'un système de lutte contre les sérotypes pathogènes d'intérêt. Ainsi ce travail vise à développer une méthode de PCR quantitative pour chaque sérotype de *T. maritimum* afin de l'utiliser dans un premier temps sur des prélèvements de poissons sauvages et d'élevage en Polynésie française. La méthode développée a été utilisée sur les prélèvements du cycle de production de *Platax orbicularis* soumis à une infection naturelle dans les fermes de Taha'a et Toahotu en 2020. La campagne d'échantillonnage est décrite dans la seconde partie de ce document au paragraphe I.

1. Matériel et méthodes

a) Les gènes d'intérêt à cibler

La première méthode de PCR quantitative a été décrite par Fringuelli et ses collaborateurs en 2012 (Fringuelli et al. 2012). A ce jour, la grande majorité des méthodes développées pour quantifier l'agent *Tenacibaculum maritimum* par qPCR ciblent une région spécifique du gène codant pour la sous unité 16S du ribosome bactérien. Les méthodes décrites permettent de quantifier l'ensemble des bactéries *T. maritimum* présentes dans les échantillons. Depuis la mise en évidence de l'existence d'une diversité sérologique au sein de l'espèce (Avendaño-Herrera et al. 2004a ; Avendaño-Herrera, Magarinos, et al. 2005), il est

fondamental de mettre au point des méthodes rapides, sensibles et spécifiques, permettant d'identifier les différents sérotypes. Une méthode de PCR multiplex est notamment en cours d'élaboration par Pierre Lopez au sein du centre Ifremer du Pacifique (données non publiées). Néanmoins, une étape d'isolement est nécessaire pour l'application de cette technique de laboratoire ce qui limite la détection au seul sérotype majoritairement présent dans l'échantillon. Ainsi, cette étude porte sur la mise au point de plusieurs PCR quantitatives permettant de mettre en évidence chacun des sérotypes d'un même échantillon et d'en obtenir la quantification.

L'objectif de cette méthode est donc de cibler des gènes spécifiques des sérotypes identifiés par les méthodes de sérotypage conventionnel. Les bactéries à Gram négatif expriment à leur surface de nombreux polysaccharides auxquels on attribue des propriétés antigéniques ayant un rôle clef dans les interactions hôte-pathogène. Plus particulièrement, les lipopolysaccharides (LPS) sont parmi les plus immunogènes (Figure 42). Ils se composent d'un lipide A, d'un composé « core » polysaccharide et de l'antigène O composé d'unités polysaccharides répétitives et qui porte la spécificité antigénique reconnue par les anticorps de l'espèce hôte. Par analogie avec des méthodes de sérotypage moléculaire développées pour d'autres bactéries (Rochat et al. 2017) il a donc été choisi de cibler des séquences variables des gènes codant pour l'antigène O.

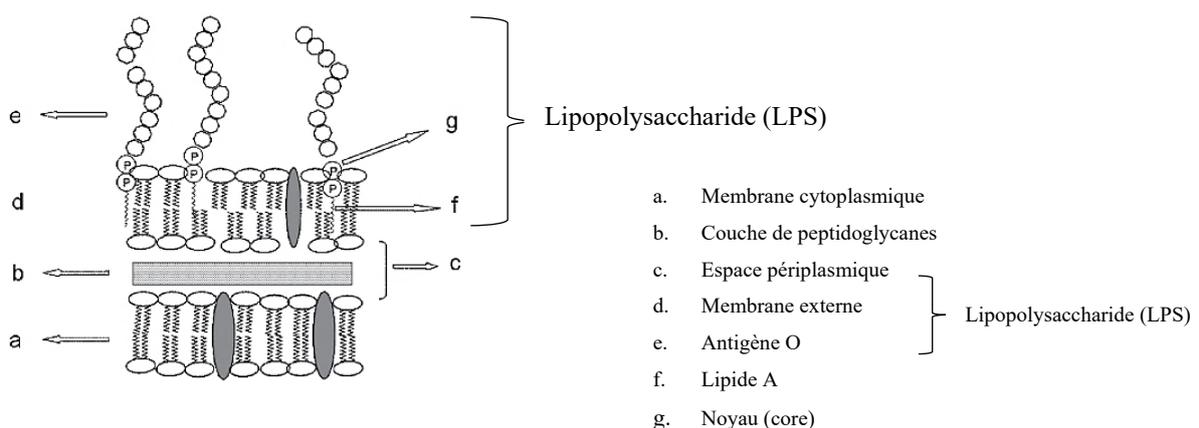


Figure 42: Représentation schématique de la structure membranaire des bactéries à Gram négatif (Adapté de Szalo et al. 2006)

Les bases de données GenBank et EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) ainsi que le logiciel Primer-3 ont été utilisés afin de rechercher des gènes spécifiques pour chaque sérotype, puis d'y dessiner des amorces. Les gènes ciblés doivent absolument être spécifiques de l'espèce *Tenacibaculum maritimum* afin de s'affranchir de l'étape d'isolement de la bactérie par culture bactériologique tout en ayant une bonne spécificité du test. Pour chaque sérotype, il faut de plus cibler une séquence identique pour les souches du même sérotype mais absente ou présentant un fort polymorphisme pour les autres sérotypes.

Pour le sérotype O1, des séquences répondant à ces critères ont pu être identifiées sur le gène MARIT_1556, identifié sur la souche de référence *T. maritimum* NCMB 2154^T. Ce gène se situe sur le deuxième locus identifié comme portant des gènes codant probablement pour l'antigène O (Figure 43). Pour les autres sérotypes, les séquences sont ciblées sur le premier locus portant des gènes probablement impliqués dans la synthèse de l'antigène O, et ciblent le gène codant très probablement pour *wzy*, une polymérase impliquée dans la synthèse du LPS. Les gènes codant probablement pour l'antigène O sont déterminés par analogie avec le génome d'autres bactéries dont *Escherichia coli* par exemple. Ainsi, un premier gène nommé *wzy1* sur la figure 43, par homologie avec le gène *wzy* retrouvé chez d'autres espèces bactériennes, a été identifié sur les souches O1 et O2. Une seconde version de ce gène *wzy2*, probablement homologue, a été repérée sur laquelle une séquence spécifique est utilisée pour cibler le sérotype O3. Enfin, un troisième gène homologue *wzy3* qui présente des séquences très spécifiques au sérotype O4 a été ciblé pour ce sérotype. La localisation des gènes ciblés au sein des loci est présentée par la figure 43.

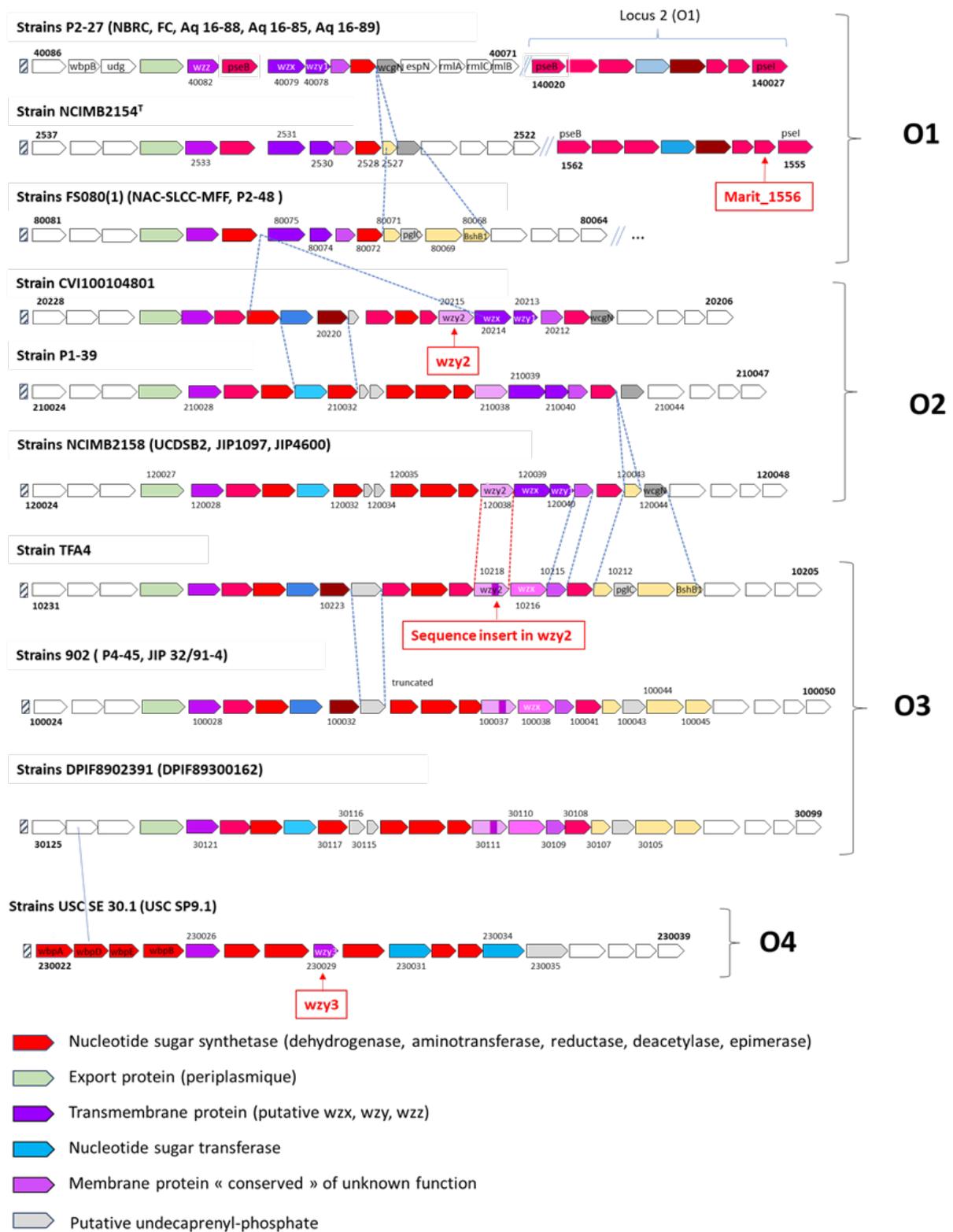


Figure 43 : Représentation schématique de deux loci, probablement impliqués dans la synthèse de l'antigène O, sur le génome des souches de *Tenacibaculum maritimum* et recherche de séquences spécifiques pour chacun des 4 sérotypes connus (O1, O2, O3, O4).

Toutefois, pour la quantification du sérotype O2, aucune région spécifique n'a pu être identifiée dans le génome, car tous les gènes considérés comme probablement impliqués dans la synthèse de l'antigène O sont également retrouvés pour les souches du sérotype O1 ou O3. Néanmoins au sein du gène homologue *wzy2*, les souches O3 contiennent une insertion de séquence qui semble leur être spécifique. Il a donc été décidé de dessiner des amorces sur les séquences de ce gène communes au deux sérotypes O2 et O3. Ensuite, la quantification du sérotype O2 seul est envisagée par une méthode soustractive retirant la quantité des souches O3, ciblant cette insertion spécifique sur le gène homologue à *wzy*, à la quantité des sérotypes O2 et O3 identifiés communément (signal O2_O3). En l'absence de signal pour le sérotype O3 dans l'échantillon, la quantification du signal O2_O3 représente alors le sérotype O2 seul (Figure 44). De la même façon, sur ce premier loci les souches de sérotype O1 partagent l'ensemble des gènes codant potentiellement pour l'antigène O avec celles du sérotype O2, qui possèdent une insertion de gènes supplémentaires. Ces gènes supplémentaires ne sont pas spécifiques du sérotype O2 car ils sont également retrouvés chez les souches O3, qui possèdent à nouveau une insertion de gènes surajoutés, retrouvés quant à eux uniquement pour ce sérotype (O3). Le sérotype O1 est ciblé à partir du gène MARIT_1556, retrouvé sur le second loci de gènes codant probablement pour l'antigène O, toutefois les souches de sérotype O2 ne contiennent pas de séquence qui leur soit spécifique au sein de ce loci.



Figure 44 : Représentation schématique de la méthode soustractive utilisée pour la quantification du sérotype O2 à partir du signal des sérotypes O2 et O3 associés (O2_O3) et du signal O3 seul.

b) Le choix des amorces de qPCR

Les différentes amorces, dessinées sur les gènes cibles sélectionnés pour chaque sérotype, ont permis d'obtenir 6 couples d'amorces (sens + anti-sens) pour cibler le sérotype O1, 3 couples pour identifier simultanément les sérotypes O2 et O3 (O2_O3) ainsi que respectivement 5 et 3 couples qui ciblent les sérotypes O3 et O4. Les séquences et la taille des amorces sont présentées dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Séquences nucléotidiques des amorces dessinées pour les réactions qPCR des sérotypes de *T. maritimum* sur les gènes codant pour l'antigène O.

Sérotype ciblé	Couple	Nom	Fonction	Séquence 5'-3'	Taille de l'amorce (pb)	Taille de l'amplicon (pb)
O1	qO1F1 / qO1R1	qO1F1	Sens (F)	TCGTTTACACTTAATAGAGTTTGATG	26	243
		qO1R1	anti-sens (R)	TTTATGAGCACTATTAATCGGACCT	25	
	qO1F1 / qPCR01R	qO1F1	Sens (F)	TCGTTTACACTTAATAGAGTTTGATG	26	148
		qPCR01R	anti-sens (R)	CTATCAATAAGTATATCTTTTGTAAT TGCT	30	
	qO1F1 / qPCRO1R2	qO1F1	Sens (F)	TCGTTTACACTTAATAGAGTTTGATG	26	148
		qPCRO1R2	anti-sens (R)	CTTTACCTTTCTTTATACTATCAATA AGT	29	
	qO1F2 / qO1R2	qO1F2	Sens (F)	AGGTCCGATTAATAGTGCTCAT	22	218
		qO1R2	anti-sens (R)	AAAACGCCTTCAACAATCCATC	22	
	qPCRO1F1 / qPCR01R	qPCRO1F1	Sens (F)	TGAAAATATCATCTAATCGTTTACAC	26	148
		qPCR01R	anti-sens (R)	CTATCAATAAGTATATCTTTTGTAAT TGCT	30	
qPCRO1F1 / qPCRO1R2	qPCRO1F1	Sens (F)	TGAAAATATCATCTAATCGTTTACAC	26	148	
	qPCRO1R2	anti-sens (R)	CTTTACCTTTCTTTATACTATCAATA AGT	29		
O2_O3	qO2+3F3 / qO2+3R2	qO2+3F3	Sens (F)	ATAAAAGTTTGTGGCTAATCTTGAG	25	246
		qO2+3R2	anti-sens (R)	CCAGTTATTATACCCTCCTTCTGG	24	

	qO2+3F1 / qO2+3R1	qO2+3F1	Sens (F)	TTAGCGTATTAAGTACATTTGG	25	138	
		qO2+3R1	anti-sens (R)	AAGATTAGCCACAACTTTTATC	23		
	qO2+3F2 / qO2+3R1	qO2+3F2	Sens (F)	AGCGTATTAAGTACATTTGGTGT	26	136	
		qO2+3R1	anti-sens (R)	AAGATTAGCCACAACTTTTATC	23		
O3	qO3F1 / qO3R1	qO3F1	Sens (F)	CTTATTGGTCTTATTAATTACAGGTA C	27	152	
		qO3R1	anti-sens (R)	CCTATTAAGTTTTAGGTGTAAGG	26		
	qO3F2 / qO3R2	qO3F2	Sens (F)	CCTTTTACACCTAAACTTTAATAGG	26	105	
		qO3R2	anti-sens (R)	ACATAATATAGCCGACATTTTGAG	24		
	qO3F3 / qO3R3	qO3F3	Sens (F)	TGTGTTAAGGTTAGTTCAGGGT	23	99	
		qO3R3	anti-sens (R)	CTGCAATGTTCCAATATGTATCA	23		
	qO3F1 / qO3R2	qO3F1	Sens (F)	CTTATTGGTCTTATTAATTACAGGTA C	27	232	
		qO3R2	anti-sens (R)	ACATAATATAGCCGACATTTTGAG	24		
	qO3F1 / qO3R3	qO3F1	Sens (F)	CTTATTGGTCTTATTAATTACAGGTA C	27	186	
		qO3R3	anti-sens (R)	CTGCAATGTTCCAATATGTATCA	23		
	O4	qO4F1 / qO4R2	qO4F1	Sens (F)	GAAATGCTTACCTATATAGGAGTGC	25	125
			qO4R2	anti-sens (R)	CCCTCCTATAGCCTTTATATATTTTC	25	
qO4F2 / qO4R2		qO4F2	Sens (F)	CCTATATAGGAGTGCAAGTTAATAA TG	27	115	
		qO4R2	anti-sens (R)	CCCTCCTATAGCCTTTATATATTTTC	25		
qO4F3 / qO4R3		qO4F3	Sens (F)	CATGTGCAAGCAAGTAAGAAGC	22	197	
		qO4R3	anti-sens (R)	TCCCAAATCTGCCATGTCTTAG	22		

La chimie de marquage utilisée pour les PCR quantitatives des différents sérotypes est la méthode Syber-Green. Le fluorophore SYBR permettant de révéler les réactions d'amplification est compris dans le mix utilisé pour la réaction, à savoir le Brilliant II SYBR MASTER MIX (Agilent). La fluorescence est révélée lorsque le fluorophore est lié à de l'ADN double brin (liaison non spécifique). Son intensité est un indicateur de la quantité d'ADN double brin présent à chaque cycle d'amplification. La qPCR est réalisée sur le thermocycler Agilent Mx3000P.

Chaque réaction est réalisée en duplicat pour un volume final de 25µL contenant 5µL d'ADN extrait des échantillons dilué à 10ng/µL, 12.5µL du réactif Brilliant II, chaque amorce à une concentration finale de 300nM (Forward et Reverse), soit 1.5µL de chaque amorce à une concentration de 4µM et 4.5 µL d'eau de qualité biologie moléculaire sont ajoutés afin de compléter le volume. Le profil thermique utilisé pour cette PCR quantitative est constitué d'un cycle de 10 minutes à 95°C, puis de 40 cycles identiques de trois étapes de trente secondes chacune à 95°C puis 60°C et enfin 72°C. Un dernier cycle composé d'une minute à 95°C, de trente secondes à 55°C puis de 30 secondes à 95°C permet d'obtenir les courbes de dissociation des réactions (annexe 5).

c) Isolement et extraction de souches de référence

Dans le cadre de l'élaboration de la méthode de PCR quantitative des différents sérotypes de *T. maritimum*, les différentes souches utilisées, comme témoin positif ou encore pour évaluer l'efficacité des réactions, sont présentées dans le tableau 14. Un témoin négatif composé d'eau de qualité biologie moléculaire a été utilisé pour chacune des étapes de culture, d'extraction de l'ADN, et des réactions d'amplification.

Tableau 14 : Les souches de référence de *T. maritimum* utilisées dans cette étude et leur origine. Les souches de référence sont présentées en gras dans le tableau.

Souche	Pays d'origine	Hôte	Année	Sérotype conventionnel	Sérotype moléculaire
NCMB 2154^T	Japon	<i>Pagrus major</i>	1977	O1	O1
NCMB 2158^T	Royaume Uni	<i>Solea solea</i>	1981	O2	O2
TFA4	Polynésie française	<i>Platax orbicularis</i>	2011	O3	O3
USC SP9.1	Espagne	<i>Salmo salar</i>	1993	O4	O4
190605A03b	Polynésie française	<i>Platax orbicularis</i>	2019	Inconnu	O1
190115A05h	Polynésie française	<i>Platax orbicularis</i>	2019	Inconnu	O2
190709D08d	Polynésie française	<i>Platax orbicularis</i>	2019	Inconnu	O3

Les souches sont conservées au sein du centre IFREMER du Pacifique à une température de -80°C. Elles ont été reprises en culture sur boîtes de Pétri contenant un milieu Marine Agar (DIFCO 2216) supplémenté en antibiotiques (composition confidentielle mise au point par le laboratoire privé LABOFARM à Loudéac, France) et incubées 24h à 27°C. Une colonie de chaque souche a ensuite été mise en culture en milieu liquide Marine Broth (DIFCO 2216) et incubée sous agitation durant 24h à 27°C. Aucune contamination des cultures n'a été observée.

Après 24h, les colonies bactériennes ont été déposées dans une solution de tampon de lyse (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%), contenant de la protéinase K à une concentration finale de 200 µg/mL (Brenner et al. 1982), et mises en incubation à 56°C pendant 12h. Puis l'ADN a été extrait avec un mélange Phénol-Chloroforme-alcool isoamylique (50 :48 :2). La quantification de l'ADN obtenu est réalisée avec le NanoDrop Thermo Scientific TM 1000.

2. Résultats

a) Optimisation de la méthode et sélection des couples d'amorces

Quelques informations sur la méthode de PCR quantitative et les outils impliqués dans son interprétation sont disponibles en annexe 5.

- Le choix de la température de la réaction

Un premier test visant à évaluer la fonctionnalité des couples d'amorces et à déterminer la température de l'étape d'hybridation des amorces a été effectué. Les réactions de qPCR ont été testées aux températures de 56°C, 58°C, 60°C et 62°C. Ces températures évaluées sont cohérentes avec les températures théoriques indiquées par le logiciel Primer-3 lors de la création des amorces.

Chaque couple d'amorces a été évalué avec un témoin positif, constitué d'ADN de la souche de référence (Tableau 14) du sérotype ciblé, et un témoin négatif d'eau de qualité biologie moléculaire, en duplicat. Pour chaque sérotype, un stock d'ADN des souches de référence a été produit en grande quantité (100pg/µL) afin d'être utilisé comme intercalibrateur pour comparer les résultats de différentes plaques. Le seuil de chaque plaque étudiée est fixé de façon à ce que l'intercalibrateur indique la même valeur de Ct pour toutes les plaques (quelques informations élémentaires sur la PCR quantitative sont disponibles en annexe 5). En PCR quantitative, la valeur de Ct correspond au cycle marquant l'intersection de la courbe d'amplification avec le seuil de la réaction, ce qui indique que la quantité d'ADN amplifié est détectable car elle dépasse le bruit de fond de la réaction (signaux non spécifiques). C'est à partir de cette valeur de Ct que la quantité de bactéries ciblées est déterminée en fonction des paramètres d'efficacité de la réaction. Ainsi, plus la concentration initiale en ADN cible est importante et moins il faudra de cycle d'amplification pour dépasser le signal émis par le bruit de fond (Ct bas). Pour les couples d'amorces O2_O3 c'est la souche

de référence de sérotype O2, soit NCMB 2158^T, qui est toujours utilisée en tant que témoin positif dans le cadre de la mise au point de la méthode.

A l'issue de ce premier test, la température de 60°C a été sélectionnée pour l'ensemble des sérotypes car c'est la température la plus élevée (ce qui augmente la spécificité du test) pour laquelle les signaux des témoins positifs indiquent une valeur de Ct cohérente (suffisamment faible pour quantifier une gamme contenant des concentrations supérieures et inférieures, pour une bonne sensibilité du test). Plusieurs couples d'amorces donnent une valeur de Ct non nulle pour les témoins négatifs (absence d'ADN cible). Il s'agit d'un signal non spécifique pouvant être émis à partir de l'assemblage de dimères ou de monomères des amorces entre elles ce qui induit un signal de fluorescence à partir d'ADN double brin différent de l'ADN cible. Pour chaque sérotype, les couples d'amorces ne donnant pas de signaux non spécifiques pour les témoins négatifs lors de ce test ont été présélectionnés. Dans la plupart des cas la valeur de Ct indique une très faible quantité d'ADN (Ct proche de 40) et la courbe de fusion permet le plus souvent de distinguer un signal spécifique correspondant à la température de fusion retrouvée pour l'ADN cible et un signal non spécifique ayant une température de fusion différente. En revanche pour le sérotype O4 les trois couples émettent un signal non spécifique pour les témoins négatifs et la courbe de dissociation peut indiquer des monomères ou dimères d'amorces avec une température de fusion similaire à celle de l'ADN cible ; deux de ces couples sont conservés malgré cela.

- Test de spécificité des réactions au sérotype ciblé à partir des souches de référence et de prélèvements du milieu naturel ne contenant pas l'agent *T. maritimum*

D'une part, un second test est réalisé afin de s'assurer que les couples d'amorces présélectionnés à l'issue du premier test sont bien spécifiques des sérotypes ciblés. Pour cela, tous les couples d'amorces ont été testés vis-à-vis de toutes les souches présentées dans le tableau 14. Presque tous les couples d'amorces testés se sont révélés spécifiques du sérotype qu'ils ciblaient. Seuls les couples d'amorces des sérotypes O3 et O4 indiquent un signal tardif (Ct > 35), confirmé non spécifique par l'analyse de la courbe de dissociation, avec un sérotype différent ou le témoin négatif. Le couple d'amorces O2_O3 indique bien une valeur positive pour chacune des souches de références de ces deux sérotypes.

D'autre part, un troisième test a été réalisé à partir d'ADN environnemental (ADNe) extrait de prélèvements de diverses natures ne contenant pas d'ADN de *T. maritimum*,

toujours dans l'optique de s'assurer d'avoir une spécificité satisfaisante pour les réactions. Ces échantillons ont été détectés négatifs d'après la méthode de PCR quantitative développée par Pierre LOPEZ (méthode décrite dans la seconde partie au paragraphe III.1). Pour cela 3 échantillons provenant de campagnes d'échantillonnages antérieures à celle analysé dans ce travail de thèse, ont été testés avec chaque couple d'amorce présélectionné à l'issue du premier test (3 couples pour le sérotype O1, 1 pour O2_O3, 2 couples pour O3 et 2 couples pour O4). Ces ADN correspondent à de l'eau de mer filtrée, du bio-encrassement déposé sur les structures d'un élevage de crevettes et du mucus de *Platax orbicularis* d'un géniteur de la filière. En parallèle, 2 prélèvements de la campagne d'échantillonnage analysée dans ce travail de thèse, et révélés négatifs à l'agent *T. maritimum* par la qPCR de Pierre Lopez, ont également été testés. Il s'agit d'un échantillon de platax asymptomatique élevé en conditions non biosécurisées en bassin extérieurs sur le site de l'écloserie VAIA (1104_Pas_VA_111) et d'un prélèvement de bio-encrassement des structures d'élevage de Toahotu (1030_B_TO_103). De la même façon que pour le test de spécificité réalisé sur toutes les souches de référence, les couples d'amorce O3 et O4 indiquent un signal tardif non spécifique pour un réplicat de l'échantillon 1104_Pas_VA_111. Des signaux non spécifiques apparaissent régulièrement pour un seul des deux réplicats et/ou avec des courbes de dissociations différentes (contenant un pic ou parfois deux pics et à des températures de fusion diverses). Cela pourrait s'expliquer par le fait que plusieurs amplicons non spécifiques peuvent être formés à partir de dimères ou de monomères d'amorces, qui n'ont donc pas tous la même température de fusion selon l'amplicon formé (dépendant de la longueur du brin d'ADN double-brin formé, du pourcentage en bases azotées G-C, etc).

- Mesure de l'efficacité des réactions de la qPCR de sérotypage

Pour quantifier chaque sérotype (O1, O2_O3, O3 et O4), l'efficacité des réactions à ensuite été évaluée en triplicat pour les couples d'amorce présélectionnés, à partir d'une gamme de dilutions de l'ADN de la souche de référence du sérotype (Tableau 14). Les différentes concentrations utilisées pour la gamme s'étendent de 10ng/μL à 10fg/μL (7 points) avec un facteur de dilution de 10, sachant que 5μL de chaque solution sont utilisés pour un puits de la plaque de qPCR. Les deux quantités d'ADN finales, incorporées dans le puits de la réaction pour la concentration la plus forte de la gamme et la plus faible, correspondent respectivement à $1,44.10^7$ et $1,44.10^1$ bactéries *Tenacibaculum maritimum*. Ces valeurs ont été déterminées à partir de la taille et de la masse du génome.

La courbe standard ayant été obtenue pour la souche TFA4 (sérotipe O3) avec le couple d’amorce conservé pour la méthode (qO3F3/qO3R3), est présenté à titre d’exemple en annexe 5. Un unique couple d’amorce par sérotipe, ayant une bonne efficacité (soit entre 90 et 110%), a ensuite été sélectionné pour la méthode. Néanmoins, l’intervalle des concentrations en ADN pour lequel la réaction a une bonne sensibilité (valeur de Ct significative) et spécificité (absence de signal non spécifique) est différent selon les réactions qPCR des sérotipes. En effet, pour le couple choisi de chaque sérotipe, il arrive parfois d’obtenir des signaux non spécifiques tardifs (toujours sous le seuil de détection fixé pour la méthode) à partir d’échantillons négatifs, avec dans de rares cas une température de fusion proche de celle de l’ADN cible. Ainsi, la plus faible dilution quantifiable a été déterminée en fonction de la valeur de Ct obtenue. Par exemple pour les couples d’amorce O1 et O3, il a été décidé de s’arrêter à une sensibilité de 100fg/μL (soit 500fg au minimum dans l’échantillon) car les valeurs de Ct de la dilution suivante (10fg/μL) étaient trop élevées (>36^{ème} cycle) et le signal risquait d’être confondu avec des signaux de fluorescence non spécifiques. D’autant plus que parfois les températures de fusion de ces amplicons non spécifiques sont proches de la température de fusion de l’ADN cible et il n’est alors pas possible de d’évaluer si le signal obtenu est spécifique ou non spécifique à partir de la courbe de dissociation.

Les données de la mesure de l’efficacité des réactions pour chaque sérotipe avec le couple d’amorce sélectionné sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Paramètres déterminant la mesure de l’efficacité de la réaction pour le couple d’amorces sélectionné pour chacun des sérotipes ciblés (O1, O2, O2_O3, O4). Les paramètres a et b correspondent respectivement à la pente et l’ordonnée à l’origine de la courbe standard et R² au coefficient de détermination.

Sérotipe ciblé	Couple	Efficacité	a	b	R ²	Gamme de concentrations	Valeurs de Ct délimitant la gamme	Nombre de bactéries délimitant la gamme	Souche de référence utilisée
O1	qO1F2 / qO1R2	100.5%	-3.311	37.18	0.997	10ng/μL - 100fg/μL	[13.59 - 29.82]	[1,67.10 ² - 1,33.10 ⁷]	NCMB 2154 ^T
O2_O3	qO2+3F2 / qO2+3R1	94.2%	-3.468	39.35	0.996	10ng/μL - 10fg/μL	[14.52 - 35.05]	[1,74.10 ¹ - 1,44.10 ⁷]	NCMB 2158 ^T
O3	qO3F3 / qO3R3	96.4%	-3.412	39.03	0.999	10ng/μL - 100fg/μL	[14.7 - 31.76]	[1,35.10 ² - 1,35.10 ⁷]	TFA4
O4	qO4F1 / qO4R2	103.8%	-3.233	34.77	0.999	10ng/μL - 10fg/μL	[11.86 - 30.85]	[1,63.10 ¹ - 1,22.10 ⁷]	USC SP9.1

- Expérimentation de la méthode pour des mélanges de sérotypes en quantités connues

Dans l'objectif de valider la méthode avant son utilisation sur les prélèvements de la campagne d'échantillonnage du cycle de plax, elle a été testée sur des échantillons contenant plusieurs sérotypes en quantité connue. Neuf échantillons de mélanges de souches de sérotypes différents ont été confectionnés à partir d'ADN extrait des souches de références. Un témoin positif composé de 5µL de l'intercalibrateur à une concentration de 100pg/µL (soit 500pg pour la réaction) et un témoin négatif (NTC) constitué d'eau de qualité biologie moléculaire ont été utilisés pour fixer le seuil de référence et valider la réaction pour chaque couple d'amorce. Pour rappel, la souche de référence utilisée en tant qu'intercalibrateur pour le couple d'amorce O2_O3 est NCMB 2158^T (sérotipe O2). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats théoriques et obtenus (2 réplicats techniques) en qPCR de sérotypage pour les mélanges de sérotypes de quantité connue. Les résultats sont indiqués en nombre de bactéries (nbr bct). Les cases rayées indiquent un signal non spécifique sous le seuil de la méthode et les délimitations rouges encadrent les cas pour lesquels le sérotype O2 n'est pas décelé. Pour les témoins négatifs dénommés NTC (*non template control*) la matrice ADN a été remplacée par de l'eau de qualité biomoléculaire.

	Composition de l'échantillon	NTC	Intercalibrateur 500pg	- 2ng O1 - 2ng O2 - 2ng O3 - 2ng O4	- 5ng O1 - 1,5pg O2 - 1,5pg O3 - 1,5 pg O4	- 1,5pg O1 - 1,5pg O2 - 5ng O3 - 1,5 pg O4	- 1,5pg O1 - 5ng O2 - 1,5pg O3 - 1,5 pg O4	- 1,5pg O1 - 1,5pg O2 - 1,5pg O3 - 5ng O4	- 2ng O1 - 20pg O2 - 5,5 pg O4	- 4,5pg O2 - 5ng O3	- 5ng O2 - 4,5pg O3	- 4,5pg O1 - 5ng O2
Quantités théoriques (nbr bct)	O1	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	1,44E+06	4,32E+02	4,32E+02	4,32E+02	5,76E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,30E+03
	O2_O3	0,00E+00	2,88E+04	1,15E+06	8,64E+02	1,44E+06	1,44E+06	8,64E+02	5,76E+03	1,44E+06	1,44E+06	1,44E+06
	O3	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	1,44E+06	4,32E+02	4,32E+02	0,00E+00	1,44E+06	1,30E+03	0,00E+00
	O4	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	4,32E+02	4,32E+02	1,44E+06	1,58E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	O2 seul	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	4,32E+02	1,44E+06	4,32E+02	5,76E+03	1,30E+03	1,44E+06	1,44E+06
Quantifications obtenues (nbr bct)	O1	0,00E+00	3,61E+04	7,38E+05	1,91E+06	2,45E+02	3,02E+02	3,57E+02	8,31E+05	1,71E+01	0,00E+00	7,56E+02
	O1	0,00E+00	4,80E+04	7,97E+05	1,80E+06	3,47E+02	3,19E+02	3,21E+02	9,29E+05	2,90E+01	1,58E+01	8,10E+02
	O2_O3	0,00E+00	3,95E+04	1,40E+06	8,45E+02	8,60E+05	2,82E+06	7,75E+02	8,52E+03	9,06E+05	2,92E+06	2,34E+06
	O2_O3	0,00E+00	3,48E+04	1,25E+06	7,16E+02	7,53E+05	2,41E+06	5,27E+02	7,56E+03	8,48E+05	2,42E+06	2,11E+06
	O3	0,00E+00	4,82E+04	1,17E+06	4,74E+02	2,71E+06	4,87E+02	4,94E+02	0,00E+00	3,17E+06	1,96E+03	0,00E+00
	O3	2,51E+00	4,08E+04	1,11E+06	5,84E+02	3,17E+06	4,84E+02	6,25E+02	0,00E+00	2,43E+06	1,94E+03	0,00E+00
	O4	0,00E+00	4,21E+04	7,48E+05	3,46E+02	3,91E+02	3,34E+02	1,90E+06	1,41E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	O4	0,00E+00	3,78E+04	7,69E+05	3,54E+02	3,27E+02	3,56E+02	1,77E+06	1,33E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	O2 calculé Moy (O2_O3) - Moy (O3)	0,00E+00	3,71E+04	1,90E+05	2,51E+02	-2,13E+06	2,61E+06	9,17E+01	8,04E+03	-1,92E+06	2,67E+06	2,22E+06

Dans la grande majorité des cas, les résultats obtenus à l'issue de la qPCR sont du même ordre de grandeur que les résultats attendus. Le rapport entre les résultats obtenus et théoriques est toujours compris entre 0,33 et 3. Néanmoins, des signaux non spécifiques (cases rayurées du Tableau 16) sont observés pour des échantillons dans lesquels le sérotype détecté n'est pas présent comme pour le puits NTC pour la quantification de O3 par exemple. Un très faible signal est par exemple détecté pour un témoin négatif avec le couple d'amorces O3 alors qu'il est composé uniquement d'eau de qualité biologie moléculaire. Toutefois il s'agit de signaux inférieurs à ceux obtenus pour la plus faible concentration d'ADN pouvant être quantifiée par la méthode (hors gamme). De plus, la non spécificité du signal est confirmée par l'analyse des courbes de dissociation.

Par ailleurs, certains mélanges de sérotypes (1,5pg O1 + 1,5pg O2 + 5ng O3 + 1,5pg O4 et 4,5pg O2 + 5ng O3) ont permis de constater que la méthode soustractive visant à quantifier le sérotype O2 ne permet pas de le détecter dans les cas où le sérotype O3 est présent en beaucoup plus grande quantité que le sérotype O2 (facteur $> 10^3$). La quantification des souches O3 masque alors celle des souches O2. Pour des quantités équivalentes (2ng O1 + 2ng O2 + 2ng O3 + 2ng O4), la soustraction des quantifications O2_O3 – O3 permet d'obtenir une quantité de sérotype O2 relativement fiable. De la même façon quand le sérotype O2 est largement supérieur au sérotype O3 (1,5pg O1 + 5ng O2 + 1,5pg O3 + 1,5pg O4), la quantification est satisfaisante.

En définitive, on obtient une quantification pour chaque réaction qui semble comprise dans un intervalle de confiance de facteur 0,33 et 3 en étudiant les rapports entre les quantifications obtenues et les quantifications théoriques (Tableau 16).

- Amélioration de la quantification du sérotype O2 à l'aide de couples d'amorce ciblant les sérotypes O1 et O2 conjointement

Le test effectué à partir d'échantillons constitués d'un mélange de sérotypes en quantité connue a permis de remarquer une des limites de la méthode. En effet, la quantification du sérotype O2 et même la détection de la présence de ce sérotype dans l'échantillon n'est pas possible lorsque le sérotype O3 est présent en beaucoup plus grande quantité (facteur $> 10^3$). Ainsi, pour tout échantillon révélant un signal O3 plus important que le signal O2_O3 ($\Delta Ct > 10$) il n'est pas possible de dire s'il contient ou non le sérotype O2. Il est simplement possible d'affirmer que si le sérotype O2 est présent il l'est vraisemblablement en moins grande quantité que le sérotype O3.

Afin d'améliorer la détection et la quantification, de nouvelles amorces ont été dessinées. Bien qu'aucun gène, probablement impliqué dans la synthèse de l'antigène O, ne puisse être identifié comme spécifique du sérotype O2 (Figure 43), il a été envisagé de procéder à une méthode « doublement soustractive ». En effet, il s'agit de quantifier les sérotypes O1 et O2 conjointement (signal O1_O2) pour en soustraire la quantité de sérotype O1, et obtenir ainsi une quantification pour O2. Il est fortement probable que les limites de la méthode soustractive O2_O3 se reproduisent avec cette méthode. Néanmoins, la comparaison des deux méthodes soustractives permettrait d'obtenir une meilleure évaluation de la quantité de sérotype O2. Ainsi lorsque le signal obtenu pour O3 est supérieur ou proche du signal obtenu pour O2_O3, on privilégierait une quantification de O2 en utilisant la méthode soustractive O1_O2.

Ainsi, trois couples d'amorces ont été créés et évalués. Ils sont présentés dans le tableau 17 :

Tableau 17 : Séquences nucléotidiques des amorces dessinées pour les réactions qPCR ciblant les sérotypes O1 et O2 de *T. maritimum* sur les gènes codant pour l'antigène O.

Couple	Nom	Fonction	Séquence 5'-3'	Taille de l'amorce (pb)	Taille de l'amplicon (pb)
qO1_O2F1 qO1_O2R1	qO1_O2F1	Sens (F)	GCAAAAAGGAAGTAATACCTATTTTACC	27	129
	qO1_O2R1	anti-sens (R)	TATCTAATCCTTAACCATAAAACTAACA	28	
qO1_O2F2 qO1_O2R2	qO1_O2F2	Sens (F)	GATAAATGGCACGCTAACTCC	21	190
	qO1_O2R2	anti-sens (R)	TTCGCTAACCGTTCGGTT	18	
qO1_O2F3 qO1_O2R1	qO1_O2F3	Sens (F)	AGCGAAAATTATGTTTCCATTATTCT	26	194
	qO1_O2R1	anti-sens (R)	TATCTAATCCTTAACCATAAAACTAACA	28	

Il a été choisi d'évaluer directement les réactions de qPCR pour les amorces O1_O2 à une température de 60°C, pour l'étape d'hybridation des amorces, ce qui a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Les tests de spécificité, à partir des souches de références de chaque sérotype et des deux échantillons négatifs, ont été effectués à l'identique de ceux des couples d'amorces testés au préalable. Un signal non spécifique a été obtenu uniquement pour le couple qO1_O2F2/qO1_O2R2, avec l'un des deux réplicats de la souche de référence USC

SP9.1 (sérototype O4) et l'un des réplicats de l'échantillon négatif (1104_Pas_VA_111). Les valeurs de Ct obtenues étaient respectivement de 35.32 et 33.78. Etant donné que la plus faible concentration en ADN de la souche NCMB 2158^T utilisée pour la mesure de l'efficacité indique une valeur de 32.12Ct pour ce couple d'amorces, les valeurs de Ct obtenues pour ces deux échantillons sont considérées comme des valeurs de Ct tardives. De plus l'analyse de la courbe de dissociation a confirmé que le signal était non spécifique.

Les paramètres d'efficacité ont été mesurés pour chacun des trois couples d'amorces évalués et les résultats sont présentés dans le tableau 18. La souche utilisée pour évaluer les couples d'amorces O1_O2 est la souche NCMB 2158^T, soit la souche de référence de sérototype O2.

Tableau 18 : Données relatives à la mesure de l'efficacité de la réaction pour les trois couples d'amorces évalués ciblant les sérotypes O1 et O2 conjointement (sérototype O1_O2). Les paramètres a et b correspondent respectivement à la pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe standard et R² au coefficient de détermination.

Sérotyp e ciblé	Couple	Efficacit é	a	b	R	Gamme de concentratio ns	Valeur s de Ct délimit ant la gamme	Nombre de bactéries délimitant la gamme	Souche de référenc e utilisée
O1_O2	qO1_O2F1 / qO1_O2R1	88.7%	-3.627	40.06	0.993	10ng/μL - 10fg/μL	[14.18 - 31.98]	[1,69.10 ² - 1,37.10 ⁷]	NCMB 2158 ^T
	qO1_O2F2 / qO1_O2R2	97.4%	-3.387	35.78	0.996	10ng/μL - 100fg/μL	[11.97 - 32.12]	[1,20.10 ¹ - 1,07.10 ⁷]	
	qO1_O2F3 / qO1_O2R1	91.9%	-3.532	38.47	0.999	10ng/μL - 100fg/μL	[13.45 - 33.92]	[1,94.10 ¹ - 1,21.10 ⁷]	

Le couple qO1_O2F2/qO1_O2R2 a été choisi pour être utilisé dans le cadre de la méthode de PCR quantitative de sérotypage car il présentait la meilleure efficacité (97.4%). Le témoin positif utilisé pour ce couple pour chaque plaque de PCR quantitative réalisée correspond à l'intercalibrateur de la souche de référence NCMB2158^T (intercalibrateur à une concentration de 100pg/μL).

La réaction de qPCR du couple O1_O2 a été évaluée à partir des mêmes échantillons de mélanges de sérotypes utilisés pour les autres couples d'amorces testés précédemment. Les résultats obtenus ont été confrontés à ceux obtenus précédemment pour les réactions ciblant les autres sérotypes. L'ensemble est présenté dans le tableau 19.

Tableau 19 : Résultats théoriques et obtenus en qPCR de sérotypage pour les mélanges de sérotypes de quantité connue. Les cases rayées indiquent un signal non spécifique sous le seuil de la méthode. Les délimitations rouges encadrent les cas pour lesquels le sérotype O2 n'est pas décelé ou quand une seule des deux méthodes soustractives indique une quantification du sérotype O2. Pour les témoins négatifs dénommés NTC (*non template control*) la matrice ADN a été remplacée par de l'eau de qualité biomoléculaire.

	Composition de l'échantillon	NTC	Intercalibreteur 500pg	- 2ng O1	- 5ng O1	- 1,5pg O1	- 1,5pg O1	- 1,5pg O1	- 2ng O1	- 4,5pg O2	- 5ng O2	- 4,5pg O1	
				- 2ng O2	- 1,5pg O2	- 1,5pg O2	- 5ng O2	- 1,5pg O2	- 20pg O2	- 5ng O3	- 4,5pg O3	- 5ng O2	- 4,5pg O1
				- 2ng O3	- 1,5pg O3	- 5ng O3	- 1,5pg O3	- 1,5pg O3	- 5,5 pg O4				
				- 2ng O4	- 1,5 pg O4	- 1,5 pg O4	- 1,5 pg O4	- 5ng O4					
Quantités théoriques (nbr bct)	O1	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	1,44E+06	4,32E+02	4,32E+02	4,32E+02	5,76E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,30E+03	
	O1-O2	0,00E+00	2,88E+04	1,15E+06	1,44E+06	8,64E+02	1,44E+06	8,64E+02	5,82E+05	1,30E+03	1,44E+06	1,44E+06	
	O2_O3	0,00E+00	2,88E+04	1,15E+06	8,64E+02	1,44E+06	1,44E+06	8,64E+02	5,76E+03	1,44E+06	1,44E+06	1,44E+06	
	O3	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	1,44E+06	4,32E+02	4,32E+02	0,00E+00	1,44E+06	1,30E+03	0,00E+00	
	O4	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	4,32E+02	4,32E+02	1,44E+06	1,58E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	O2 seul	0,00E+00	2,88E+04	5,76E+05	4,32E+02	4,32E+02	1,44E+06	4,32E+02	5,76E+03	1,30E+03	1,44E+06	1,44E+06	
Quantifications obtenues (nbr bct)	O1	0,00E+00	3,61E+04	7,38E+05	1,91E+06	2,45E+02	3,02E+02	3,57E+02	8,31E+05	1,71E+01	0,00E+00	7,56E+02	
	O1	0,00E+00	4,80E+04	7,97E+05	1,80E+06	3,47E+02	3,19E+02	3,21E+02	9,29E+05	2,80E+01	1,58E+01	8,10E+02	
	O1-O2	0,00E+00	1,46E+04	3,75E+05	4,96E+05	3,02E+02	9,08E+05	1,75E+02	1,65E+05	7,46E+02	7,82E+05	8,43E+05	
	O1-O2	0,00E+00	1,31E+04	4,27E+05	5,57E+05	3,73E+02	9,08E+05	2,24E+02	2,25E+05	6,47E+02	8,78E+05	8,48E+05	
	O2_O3	0,00E+00	3,95E+04	1,40E+06	8,45E+02	8,60E+05	2,82E+06	7,75E+02	8,52E+03	9,06E+05	2,92E+06	2,34E+06	
	O2_O3	0,00E+00	3,48E+04	1,25E+06	7,16E+02	7,53E+05	2,41E+06	5,27E+02	7,56E+03	8,48E+05	2,42E+06	2,11E+06	
	O3	0,00E+00	4,82E+04	1,17E+06	4,74E+02	2,71E+06	4,87E+02	4,94E+02	0,00E+00	3,17E+06	1,96E+03	0,00E+00	
	O3	2,51E+00	4,08E+04	1,11E+06	5,84E+02	3,17E+06	4,84E+02	6,25E+02	0,00E+00	2,43E+06	1,94E+03	0,00E+00	
	O4	0,00E+00	4,21E+04	7,48E+05	3,46E+02	3,91E+02	3,34E+02	1,90E+06	1,41E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	O4	0,00E+00	3,78E+04	7,69E+05	3,54E+02	3,27E+02	3,56E+02	1,77E+06	1,33E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	
	O2 calculé Moy(O1, O2) - Moy(O1)	0,00E+00	/	-3,67E+05	-1,33E+06	4,16E+01	9,08E+05	-1,39E+02	-6,85E+05	6,73E+02	8,30E+05	8,45E+05	
	O2 calculé Moy(O2, O3) - Moy(O3)	0,00E+00	/	1,90E+05	2,51E+02	-2,13E+06	2,61E+06	9,17E+01	8,04E+03	-1,92E+06	2,67E+06	2,22E+06	

On remarque que les résultats de ce couple d'amorce sont très régulièrement inférieurs d'un facteur 2 à 3 à ceux attendus. Pour cette raison, on observe que les deux « méthodes soustractives » sont souvent en désaccord pour les mélanges de sérotypes évalués. Toutefois, l'exemple du mélange 4,5pg O2 + 5ng O3, confirme l'intérêt d'avoir développé une méthode avec ce nouveau couple d'amorce de sérotype O1_O2. En effet, avec la méthode soustractive O2_O3 – O3, la quantification du sérotype O2 était masquée par le sérotype O3 et n'était pas décelée. Or les amorces O1_O2 permettent de déceler et quantifier le sérotype O2 par la méthode soustractive O1_O2 – O1. Pour cet échantillon, le signal émis pour le couple O1 étant non spécifique (ce qui a été confirmé par la courbe de dissociation), ce sérotype est bien absent de l'échantillon ; le signal O1_O2 émis est donc uniquement représentatif du sérotype O2. A l'inverse pour le mélange 2ng O1 + 20pg O2 + 5,5pg O4, la méthodologie est semblable mais c'est dans ce cas le signal O2_O3 qui est représentatif du sérotype O2 car le sérotype O3 est absent de l'échantillon et O1 bien présent. Lorsque le sérotype O2 est très majoritaire dans l'échantillon (mélange 1,5pg O1 + 5ng O2 + 1,5pg O3 + 1,5pg O4), les deux méthodes soustractives sont cohérentes. En revanche, les trois premiers mélanges (2ng O1 + 2ng O2 + 2ng O3 + 2ng O4, 5ng O1 + 1,5pg O2 + 1,5pg O3 + 1,5pg O4 et 1,5pg O1 + 1,5pg O2 + 5ng O3 + 1,5pg O4) mettent en évidence que si les sérotypes O1, O2 et O3 sont présents simultanément dans des proportions relativement équivalentes (O1=O2=O3 ou bien présence O1=O2 et O3 majoritaire, O2=O3 et O1 majoritaire), il devient très difficile de conclure à la présence ou l'absence du sérotype O2 et à sa quantification.

La figure ci-dessous (Figure 45) schématise les différentes situations pouvant être rencontrées et a pour objectif d'aider à l'interprétation des résultats. Ce n'est pas un tableau décisionnel dans la mesure où il n'aide pas à prendre une décision en fonction des Ct observés. En revanche il permet de mieux comprendre dans quels cas l'outil de sérotypage présente certaines limites.

Scénario théorique	O1	O3	O4	O1_O2	O2_O3
	✓	✓	✓	✓	✓
	✓	✓	✓	✗	✗
	✓	✓	✓	✗	✓
	✓	✓	✓	✓	✗
	✓	✓	✓	✓	✓
	✓	✓	✓	✓	✓

Figure 45 : Scenarii théoriques indiquant la possibilité de détecter et de quantifier l'ADN du sérotype de *Tenacibaculum maritimum* ciblé (symbole vert) ou non (croix rouge) pour les cinq méthodes de PCR quantitative développées (O1, O3, O4, O1_O2 et O2_O3) en fonction de la composition de l'échantillon. La quantité de bactéries de sérotype O1 (orange), O2 (bleu), O3 (vert) et O4 (jaune) dans l'échantillon est représentés de façon schématique par le nombre de cercles de la couleur correspondante.

b) Application de la méthode aux échantillons de terrain

L'ensemble des prélèvements de la campagne d'échantillonnage a été testé par cette méthode de PCR quantitative de sérotypage nécessitant cinq réactions par réplicat d'un échantillon, en quantifiant donc les sérotypes O1, O1_O2, O2_O3, O3 et O4. Les résultats correspondant aux prélèvements du cycle larvaire puis de l'infection naturelle sur le site de Taha'a sont présentés sur la figure 47. Ceux des poissons conservés sur le site de l'écloserie en bassins non biosécurisés entre 1g et 9g puis les prélèvements de la ferme de Toahotu sont présentés sur la figure 48. Chaque sérotype est représenté par une marque spécifique et la somme des sérotypes ayant pu être quantifiés est indiquée sous forme d'histogramme. Les seuils sont indiqués sur la figure pour chaque réaction représentée. Les sérotypes des échantillons situés sous leur seuil présentaient un signal pour lequel la courbe de dissociation indiquait une valeur de température de fusion semblable à celle de l'ADN cible. Ils sont toutefois non quantifiables car, situés sous le seuil de la méthode, ainsi ils n'ont pas été pris en compte pour le calcul de la somme des sérotypes de l'échantillon. Il peut en effet s'agir de signaux provenant d'amplicons non spécifiques mais correspondant à une température de fusion identique à l'ADN cible. Pour le sérotype O2, aucun seuil n'est indiqué car pour les méthodes soustractives, seules les valeurs au dessus des seuils de O1_O2 et O2_O3 étaient prises en compte pour en déduire la quantification du sérotype O1 et O3 respectivement. Les

signaux révélés non spécifiques suite à l'analyse de la courbe de dissociation ont été fixés à la valeur de $1,1.10^0$ bactéries, afin d'être représentés comme nuls sur les graphiques qui sont en échelle logarithmique.

Certains prélèvements affichent une valeur pour la somme des sérotypes (histogramme), alors que tous les sérotypes représentés sont en dessous de leur seuil de référence. A titre d'exemple c'est le cas des échantillons 1104_Pas_VA_111, _112 et _113 ou encore 1120_Pas_TO_138, _144 et _145. Il s'agit de prélèvements pour lesquels les méthodes O1, O3 et O4 n'ont pas pu quantifier un signal au dessus du seuil de la méthode ; en revanche les méthode O1_O2 ou O2_O3 ont permis de quantifier un signal significatif. Ainsi, une valeur quantifiable est obtenue même s'il n'est pas possible d'identifier de quel sérotype il s'agit, à savoir si cela correspond à l'un des deux ou aux deux sérotypes de la méthode concernée (O1_O2 ou O2_O3). En effet, dans la majorité des cas, les méthodes de quantification de deux sérotypes associés (O1_O2 ou O2_O3) sont simplement plus sensibles que les méthodes identifiant un sérotype unique (O1 ou O3) ce qui permet de quantifier ces mêmes sérotypes (O1 ou O3) même quand ils sont présents seuls (sérotype O2 absent). La méthode O1_O2 par exemple, plus sensible que celle de O1, permet de quantifier le sérotype O1 présent en faible quantité (inférieure au seuil de la méthode O1 mais supérieure au seuil de la méthode O1_O2) même lorsque le sérotype O2 n'est pas présent dans l'échantillon. Cette absence du sérotype O2 du prélèvement est indiquée par l'absence de signal avec la méthode O2_O3.

La quantification du sérotype O2 a été déterminée à partir de la moyenne des résultats des deux méthodes soustractives lorsqu'elles indiquaient un résultat similaire. Lorsqu'elles indiquaient des résultats divergents, la méthode donnant un résultat positif et quantifiable (au dessus du seuil) a été prise en compte s'il apparaissait cohérent qu'elle représente bien le sérotype O2 (Figure 45), par exemple dans les cas où le sérotype différent d'O2 (O1 ou O3 selon la méthode) était relié à un signal non spécifique ou non quantifiable par sa méthode individuelle (couple d'amorce spécifique à O1 ou O3). Pour 28 échantillons, les deux méthodes soustractives utilisées pour quantifier O2 ont donné conjointement des résultats positifs et très similaires. La figure 46 présente la corrélation entre les deux méthodes soustractives pour ces échantillons. On constate qu'elles donnent des résultats très similaires de façon répétable.

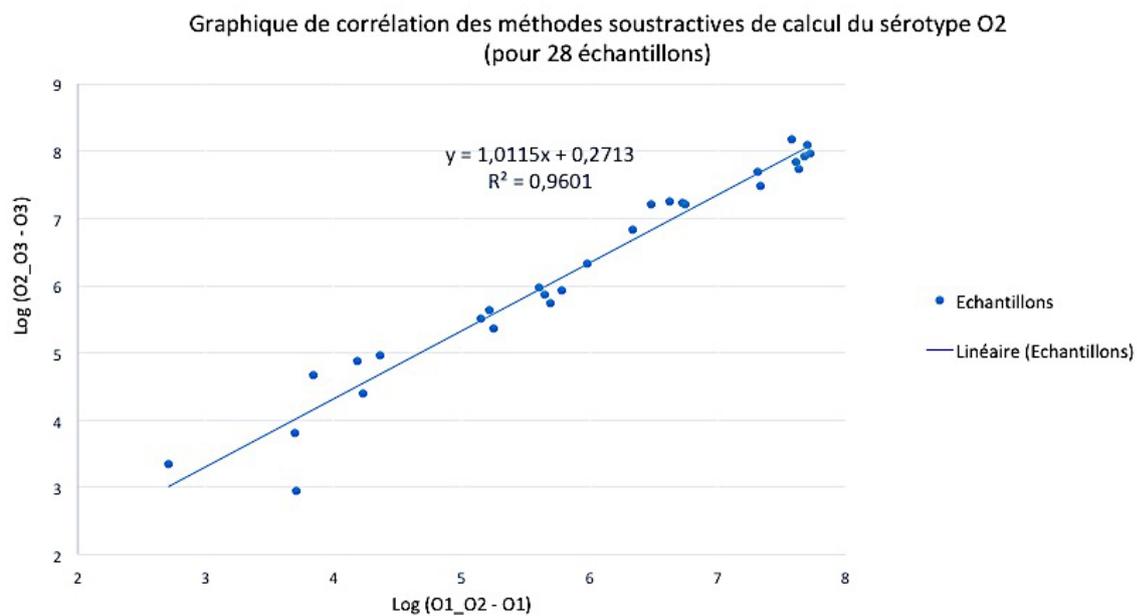


Figure 46 : Représentation graphique de la corrélation entre les deux méthodes soustractives visant à quantifier le sérotye O2.

La quantification des sérotypes de *Tenacibaculum maritimum* pour les prélèvements de l'écluserie Vaia puis de la ferme de Taha'a

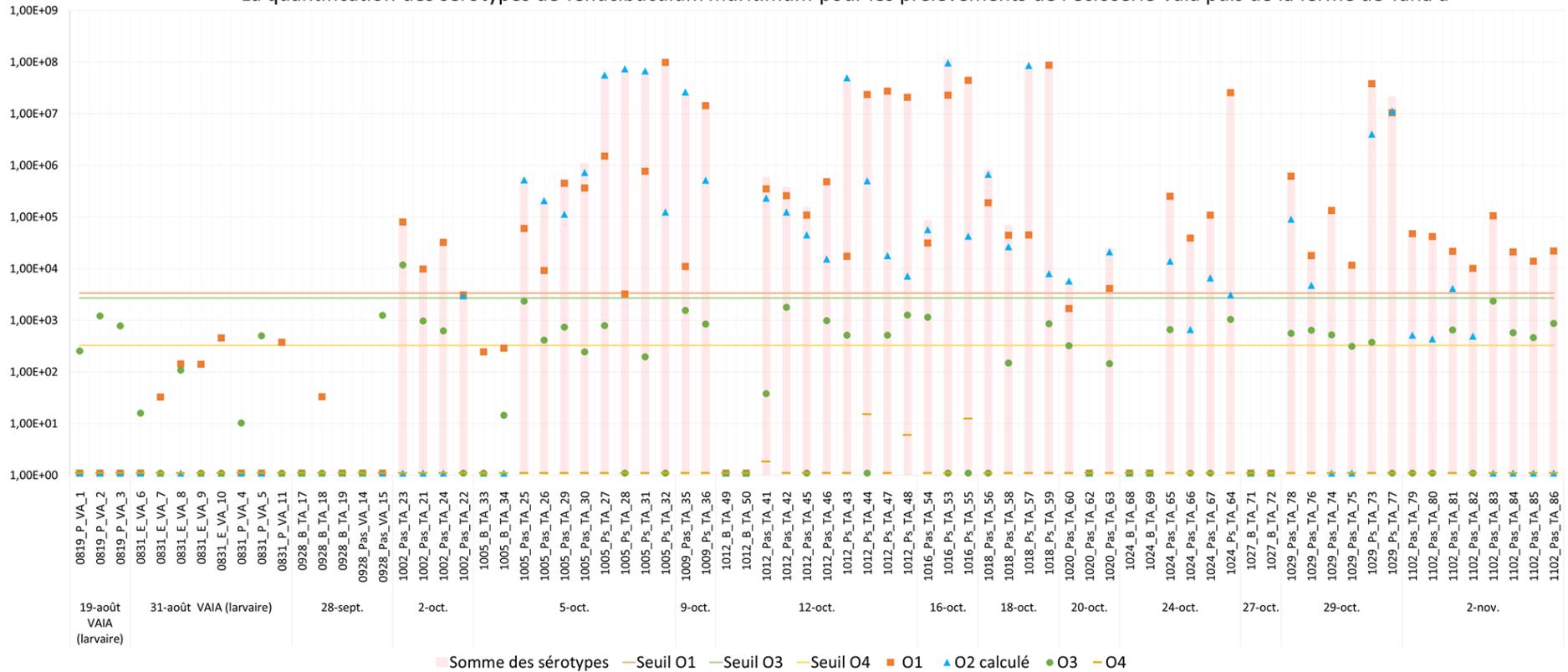


Figure 47 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons de l'élevage larvaire et de la ferme de Taha'a (en bactéries/ μ d'ADN).

La quantification des sérotypes de *Tenacibaculum maritimum* pour les prélèvements du site de Toahotu

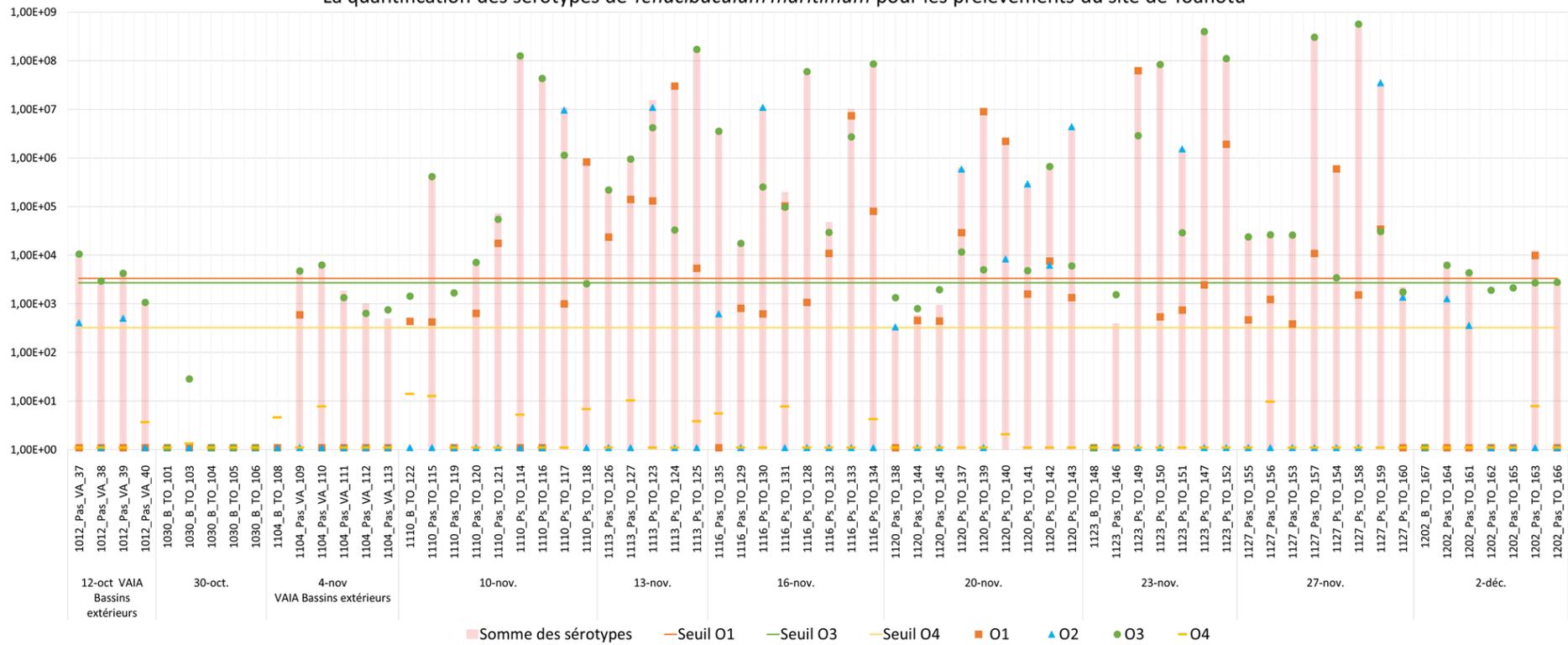


Figure 48 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons des platex sur le site de l'éclserie (en conditions non biosécurisées) entre 1g et 9g et dans la ferme de Toahotu (en bactéries/μd d'ADN).

Sur le site de Taha'a, on retrouve une quantité importante de *Tenacibaculum maritimum* de sérotype O1 et O2, tandis que le signal du sérotype O3 est quasiment toujours non quantifiable, car sous le seuil. Le site de Toahotu réunit quant à lui les trois sérotypes de façon significative, avec le sérotype O3 plus fréquemment et en plus grande quantité. Toutefois on remarque que les sérotypes O2 et O3 étaient déjà identifiés et quantifiables sur ces poissons avant leur transfert vers la ferme aquacole de Toahotu, lorsqu'ils étaient encore dans les bassins de l'écloserie Vaia en conditions non-biosécurisées entre 1g et 9g. L'hypothèse d'une introduction de ces deux souches sur le site de la ferme de Toahotu lors du transfert des poissons ne peut donc pas être exclue.

Sur le site de Taha'a plus particulièrement, on retrouve les mêmes observations que pour les analyses de métabarcoding et de la PCR quantitative développée par Pierre Lopez, à savoir que les poissons symptomatiques sont porteurs d'une plus grande quantité de *Tenacibaculum maritimum* ($>10^6$ bactéries *T. maritimum*/μg d'ADN) que les platax asymptomatiques ($<10^6$ bactéries/μg d'ADN). Pour les prélèvements de Toahotu on retrouve cette observation de façon moins systématique. Quelques échantillons de platax asymptomatiques (1113_Pas_TO_127, 1116_Pas_TO_135, 1127_Pas_TO_157) contiennent des quantités très importantes de *T. maritimum* ($>10^6$ bactéries/μg d'ADN) tandis que certains prélèvements de platax symptomatiques (n=8) sont en dessous de cette valeur, parfois de façon marquée comme l'échantillon 1116_Ps_TO_132 contenant $4,77.10^4$ bactéries/μg d'ADN.

Quelques échantillons indiquent une valeur de fluorescence très faible de détection du sérotype O4. Or, les valeurs de C_t qui y sont associées sont élevées ($>34^{\text{ème}}$ cycle) mais la valeur de la température de fusion qui leur est associée est tout de même proche de celle de la séquence ADN ciblée (d'où leur représentation sur les graphiques). Il apparaît toutefois hautement probable qu'ils s'agissent de signaux émis à partir d'amplicons non spécifiques (monomères ou dimères d'amorces). En effet lors des tests de spécificité de la méthode, des signaux similaires tardifs et sous le seuil de détection de la méthode avaient été observés avec une même température de fusion pour des échantillons connus comme ne contenant pas l'ADN ciblé.

En outre, les trois sérotypes O1, O2 et O3 sont retrouvés en quantité très importante sur les platax d'élevage en condition d'infection naturelle par *Tenacibaculum maritimum*. Aucun d'eux ne semble être prédominant par rapport aux autres au cours de l'infection, ni à l'origine d'une symptomatologie plus marquée (c'est à dire retrouvé en quantité

significativement différente des autres sérotypes sur les platax symptomatiques). On remarque également que très régulièrement deux ou trois sérotypes sont présents simultanément pour un même échantillon. A Taha'a plus de 39/61 échantillons (64%) contiennent au moins deux sérotypes quantifiables, à Toahotu 27/59 prélèvements (46%) sont concernés et 3/9 échantillons (33%) de l'écloserie Vaia des bassins en condition non biosécurisée également. Aucun des échantillons du site de Taha'a ou Vaia ne contient les trois sérotypes de façon quantifiable, en revanche sur le site de Toahotu cela concerne 5/59 prélèvements (8,5%). Dans ces cas de co-infection par plusieurs sérotypes, les résultats ne suggèrent pas de phénomène de compétition ou d'inhibition de l'un d'entre eux sur les autres, car chacun des trois peut être retrouvé prédominant avec une quantité des autres sérotypes également très importante.

3. Discussion

a) Discussion de la méthode de qPCR de sérotypage

La méthode de qPCR de sérotypage développée présente quelques difficultés d'interprétation, notamment pour l'identification et la quantification de sérotypes présents en faible quantité dans les échantillons (sous le seuil des méthodes). Par exemple la méthode peut détecter un signal non quantifiable pour le couple d'amorces O3, mais un signal faible mais quantifiable avec le couple d'amorces O2_O3 qui est plus sensible. Dans ce cas il n'est possible de conclure qu'il s'agit du sérotype O3 que si les sérotypes O1 et O2 sont absents du prélèvement, sinon les amorces O1_O2 indiquent une quantité et il n'est plus possible de déterminer précisément quels sérotypes sont présents dans le prélèvement O1 et O2, O2 et O3 ou O1 et O3. Pour cela quelques voies d'amélioration peuvent être considérées. Dans un premier temps il peut être envisagé de considérer uniquement des gammes quantifiables identiques pour chacune des méthodes O1, O1_O2, O2_O3, O3 et O4. Cela induirait une perte de sensibilité pour les techniques pouvant quantifier des gammes plus faibles mais permettrait de faciliter l'interprétation des résultats en ayant des seuils de quantification similaires et donc de répondre plus simplement à la présence ou l'absence du sérotype. Autrement, il est possible d'essayer d'augmenter la spécificité des techniques en utilisant la technologie des sondes TaqMan afin de pouvoir considérer comme quantifiables de plus faibles concentrations d'ADN, en minimisant le risque qu'il s'agisse de signaux non spécifiques induits par des monomères ou dimères d'amorces que l'on retrouve ici en chimie Syber Green. En effet les deux méthodes de qPCR en chimie TaqMan ciblant les bactéries

V.harveyi et *T.maritimum* qui ont été présentées dans la seconde partie de ce travail de thèse au paragraphe II ont permis d'obtenir des résultats strictement supérieurs aux seuils des deux méthodes (Figure 39).

Différents travaux préliminaires ont été effectués au préalable sur les échantillons analysés dans le cadre de l'élaboration de cette technique de PCR quantitative de sérotypage. Ils sont brièvement décrits au paragraphe I.3 de la seconde partie de ce document. Parmi ces méthodes, la quantification de *T. maritimum* en qPCR (méthode décrite dans la seconde partie de ce document au paragraphe III.1) comme l'identification du sérotype majoritaire par PCR multiplex de sérotypage suite à un isolement, toutes deux développées par Pierre Lopez (données non publiées), présentent un intérêt pour discuter et évaluer la pertinence de la méthode de qPCR de sérotypage mise au point.

b) Discussion sur le sérotype majoritaire identifié à partir d'un travail préliminaire de PCR multiplex de sérotypage sur des isolats

Préalablement à cette étude, les échantillons ont été isolés sur boîte de Pétri en milieu sélectif Marine Agar DIFCO 2216, dont la composition en antibiotiques est confidentielle. Puis à partir des colonies isolées, le sérotype majoritaire de *T. maritimum* présent dans l'échantillon a été identifié par une méthode de PCR multiplex de sérotypage en cours de développement par Pierre Lopez au sein du centre Ifremer du Pacifique (données non publiées). Seule une partie des échantillons de la campagne a pu être isolée, car cela nécessitait le rapatriement des échantillons concernés par avion le jour même du prélèvement. Pour 39 échantillons, il a été possible d'isoler la bactérie *Tenacibaculum maritimum* et de déterminer le sérotype d'en moyenne trois isolats pour chacun de ces prélèvements. Au total, 110 isolats de *Tenacibaculum maritimum* ont été obtenus dont 94 ont pu être sérotypés. Les résultats de la qPCR de sérotypage ont été comparés aux sérotypes des isolats identifiés. Ainsi pour 35 échantillons, le sérotype isolé majoritairement correspond au sérotype présent en plus grande quantité dans le prélèvement, soit dans 90% des cas considérés. Parfois plusieurs sérotypes sont identifiés pour un même prélèvement. Si deux isolats de sérotypes différents sont retrouvés et que l'un des deux correspond au sérotype quantifié en plus grande quantité en qPCR alors on valide la corrélation des méthodes. Hormis pour l'un de ces 35 prélèvements, les sérotypes détectés en isolement qui ne sont pas le sérotype majoritaire sont également retrouvés en qPCR de sérotypage.

Pour les quatre échantillons attestant d'une mauvaise corrélation des techniques, différentes explications correspondent à ces cas particuliers. Pour l'un deux aucun sérotype n'est quantifié, alors que des isolats sont obtenus ; cela s'explique par la détection d'inhibiteurs dans le prélèvement. Pour deux échantillons, le sérotype isolé correspond au deuxième sérotype présent en plus grande quantité, pour l'un avec une quantité très similaire (facteur 2,5), et l'autre avec une quantité bien plus faible (facteur 13). Le dernier cas particulier est un prélèvement pour lequel le sérotype O2 a été isolé et la qPCR de sérotypage a quantifié le signal des couples O1_O2 et O2_O3. En revanche, un signal positif mais non quantifiable a été détecté pour les sérotypes O1 et O3 dans le même ordre de grandeur que les signaux O1_O2 et O2_O3, il n'est alors pas possible de conclure à un sérotype majoritaire en qPCR de sérotypage, seulement à la présence du sérotype O1 et/ou O2 et/ou O3 dans la quantité retrouvée.

- c) Evaluation de la méthode de PCR quantitative de sérotypage en comparaison à la qPCR ciblant la bactérie *T. maritimum* développée par P. Lopez

Afin d'évaluer la quantification de *Tenacibaculum maritimum* obtenue à partir de la somme des sérotypes en qPCR de sérotypage, elle est comparée à celle obtenue par la méthode de qPCR développée par Pierre Lopez (méthode décrite dans la seconde partie de ce document au paragraphe III.1). Pour cela, les données des deux méthodes sont disponibles pour 120 des 142 échantillons analysés. En effet, 18 échantillons n'ont pas pu être quantifiés par la méthode de la somme des sérotypes car l'ensemble des signaux était sous le seuil des différentes méthodes et 4 échantillons n'ont pas été traités en qPCR *T. maritimum*. La corrélation des résultats est représentée dans la figure 49. La fonction affine qui lie les deux méthodes indique une pente très proche de 1 ($y=0.9611x$) toutefois la valeur du coefficient de corrélation linéaire au carré ($R^2=0.7087$) n'est pas optimale. Cette valeur est notamment induite par la prise en compte des 6 échantillons représentés en bleu sur la figure 49, pour lesquels la somme des sérotypes ne permet pas de mettre en évidence la présence de *T. maritimum* pourtant dévoilée en qPCR ciblant *T. maritimum*. Pour deux de ces échantillons, la présence d'inhibiteurs a été retrouvée. A ces 6 échantillons s'ajoutent deux prélèvements représentés au dessus et à distance de la courbe de régression linéaire pour lesquels la quantification *T. maritimum* P. Lopez est bien supérieure à la somme des sérotypes (facteur $> 10^2$). Bien que cela semble peu probable, on ne peut exclure qu'ils contiennent un nouveau sérotype n'ayant pas été identifié par la communauté scientifique. *A contrario*, trois échantillons représentés sur la figure 49 par des points situés à distance et au-dessous de la courbe de

régression linéaire donnent des quantification de la somme des sérotypes strictement supérieures à la qPCR *T. maritimum* P. Lopez. Ces échantillons de contiennent pas d'inhibiteurs. Il serait important de vérifier la répétabilité des résultats des deux méthodes afin d'exclure toute erreur expérimentale.

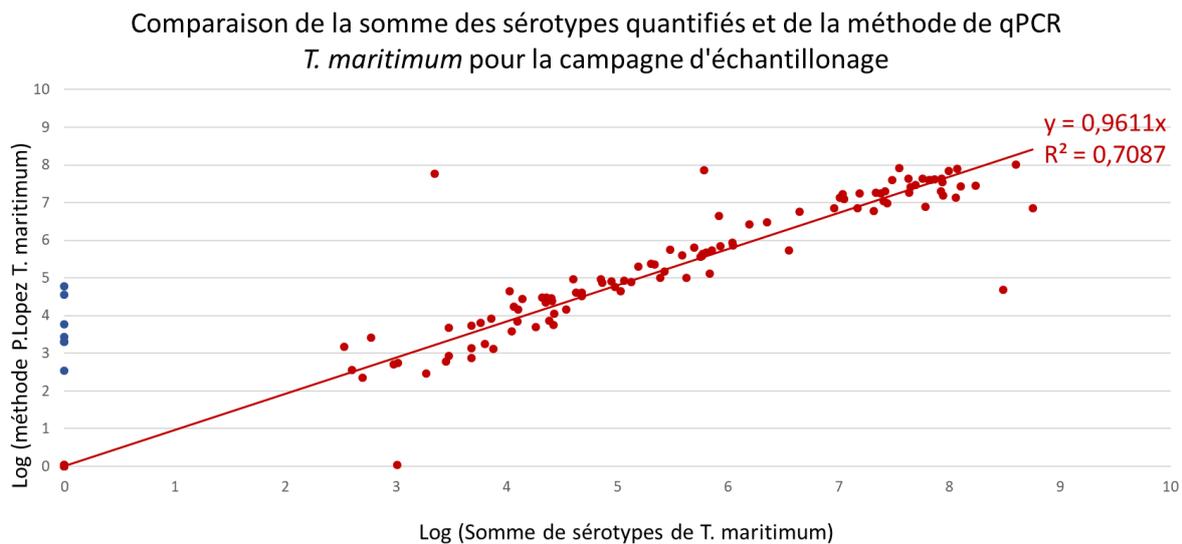


Figure 49 : Comparaison des méthodes de PCR quantitatives ciblant l'ensemble des bactéries *T. maritimum* ou la somme des sérotypes connus quantifiés, à partir de 120 échantillons de la campagne.

Parmis les 120 échantillons considérés, les deux méthodes donnent une valeur très similaire, c'est-à-dire avec une différence inférieure à un facteur 10, pour 110 échantillons soit 91,7% des prélèvements.

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode de qPCR de sérotypage et ainsi pouvoir obtenir une quantification des sérotypes actuellement inférieurs aux seuils, il faudrait pouvoir garantir la spécificité de ces signaux. Pour cela, il peut être intéressant de développer la méthode en utilisant la technologie des sondes TaqMan. Cela nécessiterait de dessiner des sondes pour chaque séquence ADN ciblée (O1, O1_O2, O2_O3, O3, O4) mais permettrait ainsi d'augmenter considérablement la spécificité des signaux et probablement de s'autoriser à quantifier une gamme plus large de bactéries.

4. Vers un scénario épidémiologique à partir de prélèvements antérieurs dans différents sites

La méthode de qPCR de sérotypage mise en place a été utilisée sur quelques échantillons prélevés au cours de l'année 2019 dans 4 sites différents. Il s'agit des fermes aquacoles de Taha'a et de Toahotu (située sur la côte ouest de la presqu'île de Tahiti), où ont été prélevés les échantillons de 2020, mais aussi d'un site à Raiatea, l'île voisine de Taha'a partageant le même lagon sans ferme piscicole, et le site de Tautira situé sur la côte est de la presqu'île de Tahiti où un élevage de Paraha peue était en activité il y a quelques années.

Les résultats sont présentés dans la figure 50 avec le même format graphique et une nomenclature similaire à celle des prélèvements de la campagne d'échantillonnage de 2020 (présentée au paragraphe I.1 de la seconde partie du document). La seule distinction dans la nomenclature de ces prélèvements est que la date indique l'année également ; elle se trouve avant le mois et le jour du prélèvement.

La quantification des sérotypes de *Tenacibaculum maritimum* pour les échantillons de cycles précédents

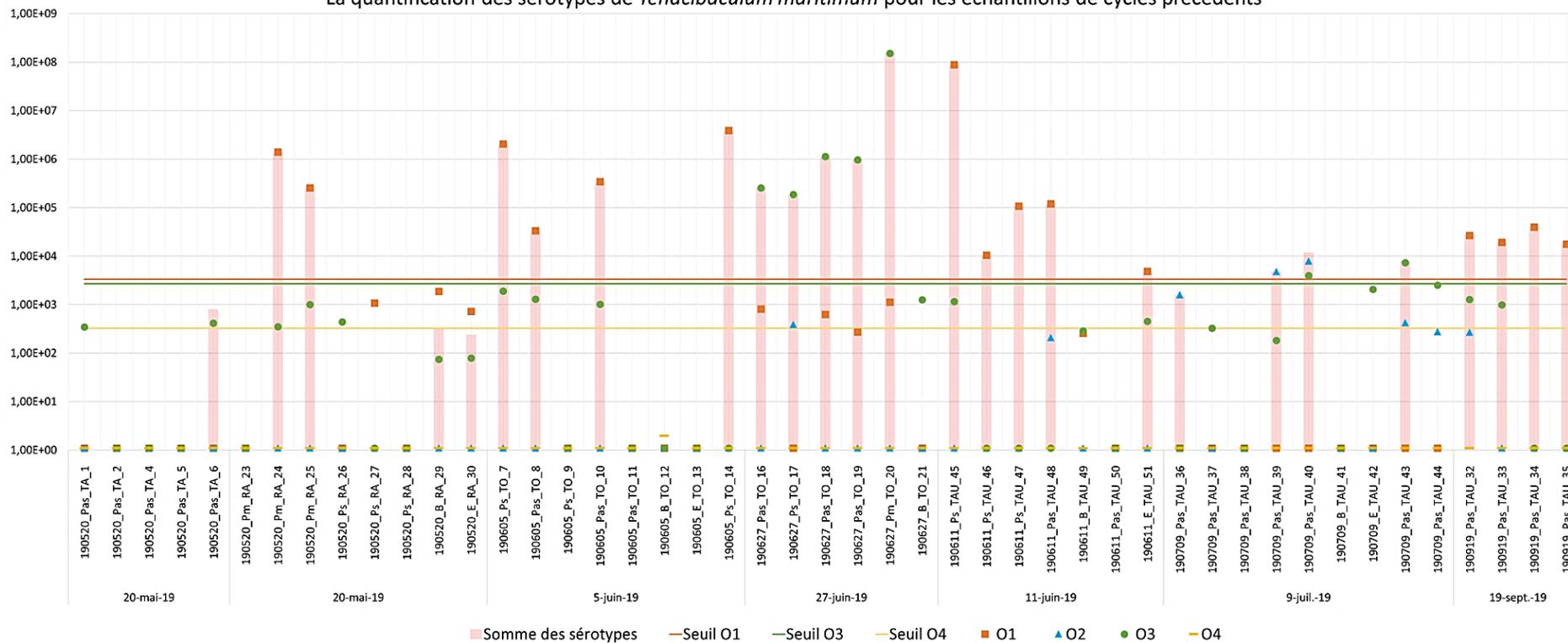


Figure 50 : Quantification des sérotypes O1, O2 (par méthode soustractive), O3, O4 et leur somme totale pour les échantillons des platex sur le site de l'écloserie (en conditions non biosécurisées) entre 1g et 9g et dans la ferme de Toahotu (en bactéries/ μ d'ADN).

On retrouve à Taha'a un signal quantifiable donné par le couple d'amorces O2_O3 en mai 2019 et à Raiatea, l'île qui partage le même lagon, le sérotype O1 et un signal O2_O3 sont identifiés. Pour plusieurs échantillons, 190520_Pas_TA_6 par exemple, le signal O3 est sous le seuil de la méthode et la quantification est donnée par les amorces O2_O3, ayant une meilleure sensibilité. C'est la raison pour laquelle le sérotype O3, indiqué sous le seuil de la méthode, est différent de la quantification de la somme des sérotypes indiquée. Il est toutefois très probable que seul le sérotype O3 soit présent dans l'échantillon car le couple O1_O2 n'indique aucun signal. Les observations sont similaires pour les échantillons 190520_Ps_RA_29 et 190520_E_RA_30, pour lesquels la quantification est possible à partir du couple d'amorces O1_O2 mais pour lesquels le signal de O1 est sous le seuil de quantification de la méthode. La méthode O2_O3 donne un signal nul pour l'échantillon 190520_E_RA_30 donc seul le sérotype O1 semble présent. On a tout de même un faible signal pour le sérotype O3 également sous le seuil et très probablement non spécifique car le signal O2_O3 est nul. Pour l'échantillon 190520_Ps_RA_29, le signal O2_O3 est non quantifiable également ce qui suggère l'absence des sérotypes O2 et O3.

A Toahotu, dans les prélèvements de l'année qui précède la campagne d'échantillonnage qui est analysée tout au long de ce travail de thèse, les sérotypes O1, O2 et O3 étaient déjà identifiés sur le site. Il y avait donc déjà présence du sérotype O3 sur la ferme, avant le transfert des poissons depuis l'écloserie Vaia le 4 novembre 2020 porteurs du sérotype O3. A savoir que les sites de l'écloserie Vaia et de la ferme de Toahotu sont situés à quelques kilomètres à peine. A Toahotu les quantités des trois sérotypes sont variables et de nouveau aucun d'eux n'apparaît prédominant ; seul O2 est toujours inférieur à O1 ou O3 pour les échantillons analysés.

Sur le site de Tautira, les sérotypes O1, O2 et O3 sont identifiés et quantifiables, avec le sérotype O1 présent en plus grande quantité dans la majorité des échantillons.

Ainsi, on constate que dans plusieurs sites, Toahotu et Tautira, les trois sérotypes sont présents. A Taha'a on soupçonne fortement la présence du sérotype O3, or dans les échantillons de la campagne de 2020 les sérotypes O1 et O2 ont été clairement identifiés, ainsi à ce jour les trois sérotypes y ont déjà été identifiés. Sur Raiatea, île sans élevage de platax, seul le sérotype O1 a été détecté avec certitude.

V. Infection expérimentale : aspects cliniques et lésionnels d'une infection par les trois sérotypes de *T. maritimum* et essai vaccinal

La PCR quantitative de sérotypage mise en place a révélé qu'en condition d'infection naturelle, les *Platax orbicularis* étaient porteurs de quantités variables et souvent importantes de différents sérotypes de *Tenacibaculum maritimum*. En effet sur les sites de Taha'a et Toahotu, respectivement 64% et 46% des prélèvements contiennent au moins deux sérotypes quantifiables. Les sérotypes O1, O2 et O3 semblent effectivement être les seuls présents en Polynésie française.

En outre, malgré les recherches déjà menées dans le but de trouver une solution éco-responsable durable contre la ténacibaculose (complémentation alimentaire à partir de plantes et d'une algue locale, recherche de gènes de résistance chez le platax), aucune n'a permis de conférer un effet protecteur significatif contre l'infection. Le travail de cette thèse, portant sur l'étude des communautés de bactéries et des populations de *Tenacibaculum maritimum*, s'inscrit dans la volonté de trouver une solution durable contre la ténacibaculose qui induit des pertes importantes dans les élevages de platax. La recherche d'un protocole vaccinal constitue un espoir prometteur pour la filière.

Un vaccin inactivé adjuvé FM 95 est commercialisé en Espagne pour une administration par injection aux turbots et salmonidés d'élevages (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000). Le protocole vaccinal consistait à l'origine en une baignade des individus à un poids de 1 à 2g, suivi d'un rappel de vaccination par injection à un poids de 20 à 30g. La protection vaccinale était estimée à 50% par baignade et augmentait jusqu'à plus de 85% avec une injection intrapéritonéale (Toranzo et al. 2005). Le mode d'administration actuellement conseillé consiste en une injection intrapéritonéale de 0.1 à 0.2mL par poisson, selon le poids, ce qui a permis d'obtenir un taux de survie supérieur à 90% (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000). Néanmoins, bien qu'efficace en Espagne pour les espèces ciblées (Romalde et al. 2005), ce vaccin commercial semble donner des résultats variables lorsqu'il est administré à différentes espèces ou à travers le monde. C'est pourquoi, d'autres vaccins ont été élaborés dans le but de protéger d'autres espèces piscicoles, comme la sole en Espagne (Romalde et al. 2005), ou pour être efficaces contre des souches isolées localement, en Tasmanie notamment (van Gelderen 2007). Or, les différentes efficacités vaccinales peuvent s'expliquer par la variabilité antigénique de *T. maritimum* répartie en quatre sérotypes

(Avendaño-Herrera et al. 2004a ; Toranzo et al. 2005) ce qui n'est pas pris en compte dans l'élaboration de ces vaccins. Le vaccin commercial FM95 n'est élaboré qu'à partir d'antigènes provenant d'une souche de sérotype O2 qui a été isolée sur des turbots d'élevage.

En outre, la PCR quantitative de sérotypage a mis en évidence que les trois sérotypes (O1, O2 et O3) détectés en Polynésie pouvaient être présents conjointement en quantité importante lors des infections naturelles sur les fermes de Taha'a et de Toahotu. Par ailleurs, la présence de poissons symptomatiques et porteurs uniquement d'un seul sérotype semble indiquer que tous les sérotypes sont pathogènes. Il apparaît ainsi primordial de tenter de conférer une immunité dirigée contre les trois sérotypes. Un essai vaccinal adapté aux souches et sérotypes retrouvés localement ainsi qu'aux besoins et contraintes de la filière du platax a été expérimenté. Le protocole de vaccin trivalent local a été évalué par une exposition expérimentale aux trois souches utilisées pour la vaccination. Le pouvoir pathogène de ces souches a aussi été testé en parallèle de l'essai vaccinal. Cette dernière expérimentation sur la virulence des souches de *Tenacibaculum maritimum* s'inscrit dans la thèse universitaire de Pierre Lopez.

CONSIDERATIONS ETHIQUES

En l'absence de comité d'éthique en Polynésie française, les expériences *in vivo* présentées répondent à toutes les sections de la délibération n° 2001-16 APF de l'Assemblée de Polynésie française publiée au Journal Officiel de Polynésie française le 1er février 2001, traitant du bien-être des animaux domestiques ou sauvages. Des règles de bien-être et de protection animale ont été suivies (Direction de la biosécurité, Ministère de l'économie verte et du domaine en charge des mines et de la recherche Polynésie française 2020). Plus spécifiquement, les poissons ont été euthanasiés en utilisant une surdose de Benzocaïne (solution mère de 150 mg/L préparée dans de l'éthanol). Cette méthode d'euthanasie, reproductible et sans danger pour l'opérateur, induit une dépression de l'activité du système nerveux central, une inconscience rapide et la mort des poissons, sans compromettre les analyses microbiologiques et histologiques. Les poissons euthanasiés correspondaient à ceux qualifiés de moribonds, présentant des symptômes caractéristiques de la ténacibaculose, et qui avaient perdu leur capacité à se maintenir dans la colonne d'eau et à adopter une nage coordonnée pour échapper aux filets. Au cours de toutes les expériences de cette étude, les poissons ont été surveillés par des spécialistes en pisciculture afin de s'assurer que les aspects éthiques étaient respectés.

1. Matériel et méthodes

Les deux expérimentations visant à tester un vaccin local trivalent et à évaluer la virulence des souches lors d'une infection par les différents sérotypes locaux (O1, O2 et O3), ont été réalisées conjointement. Pour cela, il a été choisi de procéder à une infection expérimentale à deux stades physiologiques différents, à savoir 42 jours post-éclosion (pour un poids d'environ 1g) et 54 jours post-éclosion (à un poids de 5-6g). Les modalités de cette seconde infection sont décrites dans ce document mais les résultats, n'ayant pas encore été obtenus, ne seront pas présentés.

De plus, dans le cadre de l'essai vaccinal, une infection naturelle de poissons vaccinés à un poids d'approximativement 6g (soit environ 54-60 jours post-éclosion) a été organisée. Toutefois, plusieurs semaines sont nécessaires pour la survenue de l'épisode infectieux en milieu naturel et les résultats ne sont pas encore obtenus. Pour ces raisons, les données ne sont donc pas communiquées dans ce document.

Les contraintes et infrastructures actuelles de la filière nécessitent une mise en cage lagunaire des platax à un poids de 10g. Le protocole vaccinal a été élaboré afin de répondre à ces critères.

a) La production des *Platax orbicularis* de l'expérience

L'élevage des *Platax orbicularis* utilisés pour l'expérimentation a été assuré par le personnel spécialisé en zootechnie aquacole du centre de recherche de l'IFREMER du Pacifique. Les œufs sont issus d'un lot de géniteurs (lot 17) approvisionnant régulièrement l'écloserie de production VAIA. Les lots de reproducteurs sont issus de poissons sauvages capturés en Polynésie française. La ponte est survenue le 8 juillet 2021 et le taux de fécondation était de 99%. Trente-six mille œufs ont été utilisés pour cette étude et répartis dans des bassins circulaires noirs en fibre de verre d'un volume de 210L. Les densités de l'élevage étaient de 20 œufs/L, à une densité finale au sevrage de 3,4 larves de 100mg/L pour l'élevage larvaire (de 0 à 0,1g). Ensuite, l'alevinage a été assuré à une densité de 1,4 alevins/L jusqu'aux premières expérimentations (entre 0 et 0,8g).

L'alimentation des poissons était composée de proies vivantes (*Brachonius* sp. et *Artemia* spp.) jusqu'aux jours 16 à 23 post-éclosion, lors desquels le sevrage a été fait progressivement vers un aliment commercial inerte constitué de micro-granulés allant de 0,3 à 1mm pour les gammes Micro-Gemma et Gemma (Skretting, Stavanger, Norvège) et de 1 à 1,3 mm pour les gammes Ridley (Le Guessant).

L'élevage des platax a été fait dans des conditions bio-sécurisées jusqu'à l'infection pour les deux stades physiologiques (42 et 54 jours post-éclosion). C'est à dire que l'eau de mer est prélevée dans le lagon par un système de pompes, elle est filtrée par un filtre à sable de 300µm et par deux filtres à poches de 25µm et 10µm, puis traitée aux rayons ultra-violets (300 mJ/cm²). Le renouvellement d'eau était de 1L/min. Un siphonnage des bacs était réalisé deux fois par jour. Après les 3 premiers jours post-éclosion en obscurité, la photopériode était de 12h de luminosité par jour pendant l'élevage larvaire.

b) Les protocoles de culture bactérienne et de préparation des suspensions vaccinales

Le protocole de culture bactérienne des trois souches locales de sérotype O1 (190605A03b), O2 (souche 190115A05h) et O3 (souche TFA4) est identique pour les deux suspensions vaccinales ainsi que pour l'obtention des suspensions bactériennes utilisées pour les infections expérimentales.

▪ Le protocole des cultures bactériennes

Les trois souches de *Tenacibaculum maritimum* sont issues de la souche de référence du centre Ifremer du Pacifique. Elles sont conservées à une température de -80°C. Vingt microlitres de chaque souche sont étalés sur boîte de Pétri contenant un milieu Marine Agar de DIFCO complété en antibiotiques pendant 36h à 27°C. Une colonie de chaque souche est ensuite prélevée et ré-ensemencée dans 5 mL de milieu de culture liquide Marine Broth de DIFCO à 27°C pendant 24h pour réaliser une préculture. Après 24h d'incubation, 50 µL de chaque pré-culture est ensemencé dans un erlenmeyer stérile d'un volume de 1L, contenant 200 mL de milieu de culture Marine Broth de DIFCO. Les erlenmeyers sont incubés à 27°C pendant 36h sous agitation constante de 200 tours par minute (tpm). En parallèle, pour chaque pré-culture un prélèvement dilué au millième est effectué, dont 20 µL sont étalés en boîte de Pétri contenant un milieu Marine Agar de DIFCO afin de s'assurer de la pureté des pré-cultures. Ensuite, les concentrations de chaque souche ont été évaluées par comptage en cellule de Malassez, par spectrophotométrie et par étalement sur boîte des (50µL) dilutions au 100 000 et 1 000 000^{ème}. Seuls les résultats obtenus en cellule de Malassez sont présentés dans ce travail.

Ce protocole d'obtention des cultures de bactéries en milieu liquide a donc été opéré quatre fois : deux fois pour préparer les suspensions vaccinales et deux fois pour les suspensions servant aux infections expérimentales.

- Le protocole de préparation des suspensions vaccinales

Deux suspensions vaccinales ont été préparées, la première pour une vaccination par balnéation et la seconde pour un rappel de vaccination par injection. Il s'agit de suspensions vaccinales inactivées et adjuvées. Les adjuvants utilisés sont de la marque MONTANIDE mais les produits diffèrent pour chacune des deux suspensions.

Les cultures bactériennes en milieu liquide MARINE Broth de DIFCO de chaque souche ont été obtenus selon le protocole des cultures bactériennes décrit ci-dessus. Les agrégats bactériens formés dans les cultures en milieu liquide sont dispersés avec l'utilisation d'un Ultraturax pendant plusieurs minutes. Les cultures en milieu liquide sont ensuite réparties dans des tubes falcon de 50 mL. Les tubes sont centrifugés à 5000g pendant 30 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé, puis, les culots sont remis en suspension dans du *Phosphate-Buffered-Saline* (ou PBS). L'inactivation des bactéries est réalisée par ajout de formaldéhyde à la concentration finale de 0,6% (soit l'ajout de 300µL d'une solution de formaldéhyde à 37% par Falcon de 50mL de culture bactérienne). Les tubes sont mis à incubation à 27°C sous agitation pendant 4h, puis ils sont conservés à 4°C pendant 48h. Trois lavages successifs sont réalisés par centrifugation des tubes à 5000g pendant 30 minutes à température ambiante, puis par élimination du surnageant et resuspension des culots dans 50mL de PBS. Lors du dernier lavage, les culots des tubes de chaque souche sont rassemblés dans un même tube falcon de 50mL. Un contrôle de stérilité par étalement sur milieu de culture Marine Agar de DIFCO est réalisé pour chaque souche à partir de 50µL de suspension bactérienne inactivée.

Pour la suspension vaccinale de balnéation, 300mL de suspension bactérienne ont été obtenus pour chacune des trois souches. La concentration des trois cultures était de 6.10^8 bactéries/mL. Les cultures bactériennes inactivées et lavées avec du PBS sont rassemblées de façon équimolaire et diluée dans du PBS stérile pour obtenir un volume de 800mL de suspension vaccinale. Huit cent millilitres de l'adjuvant MONTANIDE 1312VG sont ajoutés à la suspension. Cet adjuvant est spécialement conçu pour la vaccination de poissons par balnéation (Soltani et al. 2014). Il est constitué de micro-émulsion (de 10 à 500 nm) et d'un composé immunostimulant. Une homogénéisation sous agitation est réalisée pendant 24h puis la suspension vaccinale est conservée à 4°C. Le bain de balnéation final est de 16L au total comprenant 1,6L ou 10% de suspension vaccinale (5% de suspension de bactéries inactivées et 5% d'adjuvant) et 14,4L ou 90% d'eau de mer filtrée et désinfectée aux UV. La concentration finale du bain de balnéation est à la concentration de $3,5.10^7$ bactéries/mL.

Pour la suspension vaccinale par injection, 300mL de suspension bactérienne pour chacune des trois souches ont été obtenus à la concentration de 4.10^8 bactéries/mL. Les trois suspensions bactériennes inactivées et lavées au PBS ont été réunies de façon équimolaire dans un volume final de 56 mL à la concentration de 1.10^9 bactéries/mL. L'adjuvant utilisé est le produit MONTANIDE Gel 02 (Wangkaghart et al. 2021), il est composé d'une dispersion de particules de gel de polyacrylate de sodium. Quatorze millilitres d'adjuvant ont été ajoutés à la suspension bactérienne, sous agitateur magnétique à 1500 tpm pendant 10 minutes. Ainsi la suspension de vaccination par injection est de 70mL avec une composition de 20% d'adjuvant MONTANIDE Gel 02 et de 80% de suspension bactérienne trivalente inactivée à la concentration de 1.10^9 bactéries/mL. La suspension est conservée à 4°C.

c) La réalisation des étapes de vaccination et d'infection

- Un protocole vaccinal en deux administrations, chacune évaluée par infection expérimentale

Le protocole vaccinal (Figure 51) consiste en une première vaccination par balnéation le 32^{ième} jour post-éclosion (au poids de 500 à 600mg). Environ 225 poissons sont soumis à une première infection expérimentale 10 jours après la vaccination (soit au 42^{ième} jour post-éclosion) afin d'évaluer s'il existe un premier effet protecteur précoce du vaccin vis à vis de la ténacibaculose. Un lot de poissons vaccinés par balnéation et non soumis à l'infection expérimentale est vacciné par injection de rappel 15 jours après la balnéation (au 47^{ième} jour post-éclosion). Deux-cent-vingt-cinq de ces poissons sont soumis à une infection expérimentale 13 jours après le rappel (au 60^{ième} jour post-éclosion).

De plus, une infection naturelle a été organisée pour des poissons vaccinés par balnéation, par balnéation et injection, non vaccinés (témoins), balnés avec de l'eau de mer stérile et des poissons ayant reçu, après une balnéation à l'eau de mer stérile, une injection avec du PBS. Ces dernières catégories « faussement vaccinés » sont utiles pour estimer les mortalités ou lésions dues à l'acte vaccinal et non à la suspension de vaccination (Figure 51).

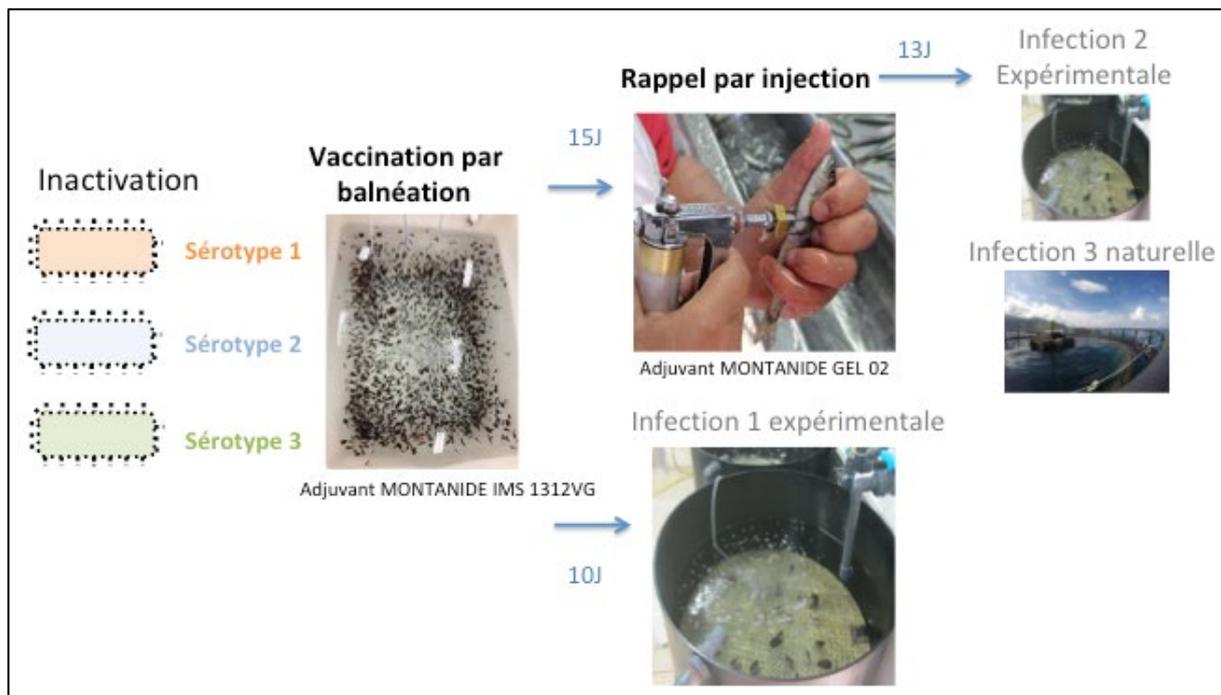


Figure 51 : Le protocole vaccinal et les infections expérimentales puis naturelles associées

- L'acte de vaccination par baignation

La vaccination par baignation consiste en une immersion des platax de 32 jours d'âge pendant une minute dans le bain de vaccination à la concentration de $3,5 \cdot 10^7$ bactéries/mL. Ce bain de 16L contient 90% (14,6L) d'eau de mer filtrée et traitée aux UV et 10% (1,6L) de suspension vaccinale. La suspension vaccinale se compose de 50% de la suspension de bactéries *T. maritimum* inactivées équimolaire des souches 190605A03b (O1), 190115A05h (O2) et TFA4 (O3) ainsi que de 50% de l'adjuvant MONTANIDE IMS 1312VG. Mille poissons ont été vaccinés par immersion dans ce bain de 16L en deux lots successifs de 500 animaux. Ils ont été réunis dans un bac de rinçage commun à l'issue de la vaccination afin d'être ensuite répartis aléatoirement dans les bacs de l'élevage expérimental. Une densité similaire de poissons (800 animaux) a été « faussement baignée » dans de l'eau de mer filtrée et traitée aux UV selon le même protocole, en deux lots équitables. Aucune mortalité ni lésion n'a été observée sur ce lot suite à la procédure réalisée.

- L'acte de vaccination par injection

La vaccination par injection consiste en l'administration de 0,05mL de la suspension vaccinale dans la cavité intrapéritonéale à l'aide d'une aiguille 26G montée sur une seringue de 1mL, soit $5 \cdot 10^7$ bactéries/platax. Le point d'injection est situé sur le flanc droit du platax

(âgé de 47 jours) à un point marquant le premier quart de l'axe ventro-dorsal positionné au niveau de l'anus de l'animal (Figure 52).

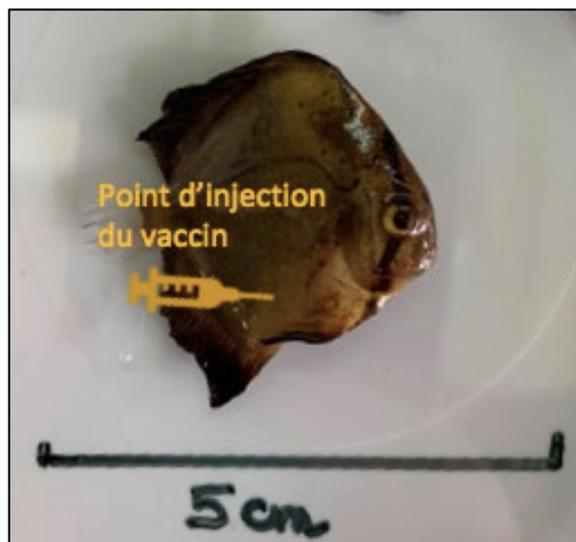


Figure 52 : Position du point d'injection de la suspension vaccinale dans la cavité péritonéale d'un platax de 47 jours d'âge.

Un total de 550 poissons, ayant été vaccinés par balnéation 15 jours au préalable, a reçu un rappel de vaccination par injection. Suite à l'injection vaccinale, une forte mortalité à très court terme (quelques minutes) et court terme (7 jours) est survenue. Au total 275 platax, soit 50% des poissons ayant reçu une injection de la suspension vaccinale sont morts dans les 7 jours suivant le rappel de vaccination. Un lot de 300 poissons a reçu une injection contenant du PBS selon un protocole identique. Aucune mortalité n'a été observée sur ce lot « faussement injecté » suite à l'acte d'injection. Ainsi l'acte d'injection n'est pas mis en cause, la suspension vaccinale ou l'un de ses composants est à l'origine des mortalités constatées.

- Les infections expérimentales

La première infection expérimentale est réalisée dans des bacs de 40L contenant 20L d'eau de mer filtrée et traitée aux UV. Les cultures des trois souches ont été quantifiées à environ 4.10^8 bactéries/mL. Un volume de 16mL de bactéries en culture a donc été incorporé à chaque bain d'infection. Le bain d'infection était à une concentration finale de $3,2.10^5$ bactéries/mL. Selon la condition évaluée, ce volume de culture bactérienne contenait une souche unique (O1, O2, O3), du milieu de culture stérile (condition témoin) ou un mélange équimolaire des trois souches (soit un mélange de 5,3mL de chacune des trois souches). En moyenne 75 [72-79] poissons ont été déposés dans chacun des 18 bacs contenant 20L d'eau de mer filtrée et traitée (UV) avec bullage. Deux heures après l'incorporation des suspensions

d'infection dans les 18 bacs, les poissons ont été pêchés pour être déposés dans 18 bacs de rinçage contenant de l'eau de mer filtrée et traitée (UV). Ils ont ensuite été mis dans les bacs d'élevage de 210L de la salle expérimentale. La seconde infection est organisée de façon similaire, toutefois les poissons seront infectés dans un volume de 40L d'eau de mer filtrée et traitée aux UV avec une concentration en agent infectieux souhaitée de $3,2 \cdot 10^5$ bactéries/mL également.

- Les conditions d'élevage en conditions d'infection

Les deux infections expérimentales sont organisées conjointement à une expérimentation visant à évaluer la virulence des souches de sérotype O1, O2 et O3. La salle utilisée pour les infections expérimentales 1 et 2 est identique (Figure 53). Un nettoyage au chlore ainsi qu'un vide sanitaire de 6 jours ont été réalisés entre la fin de la première infection (poissons de 42 jours d'âge) et la mise en place de poissons pour l'acclimatation des animaux en vue de la seconde infection expérimentale (poissons de 60 jours d'âge).

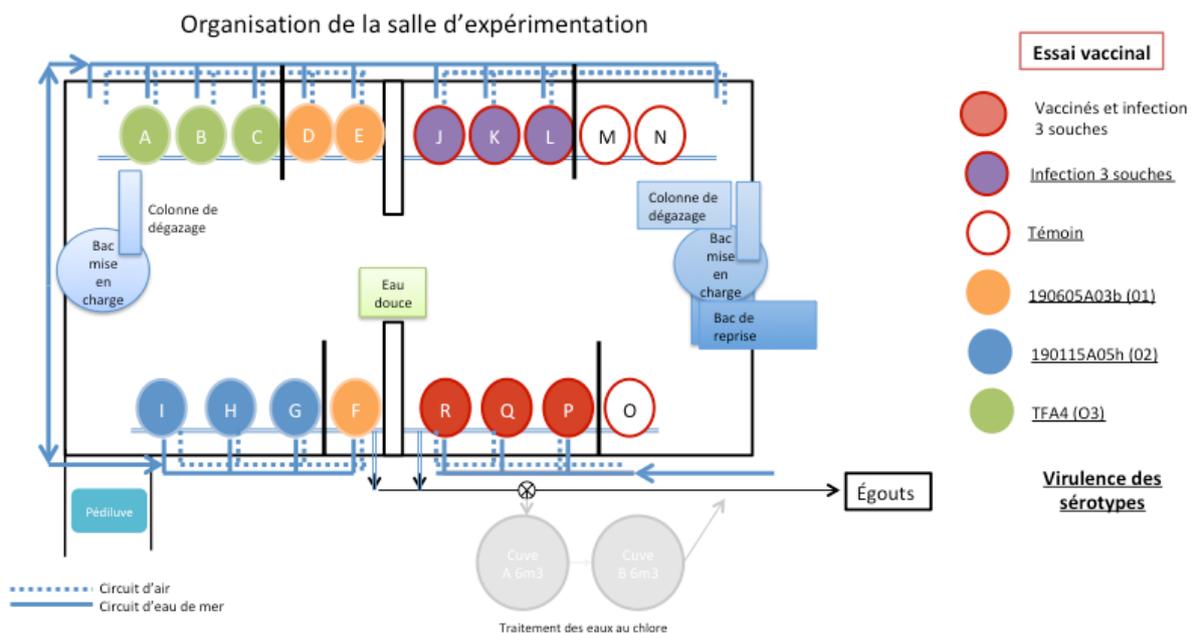


Figure 53 : Plan de la salle expérimentale et répartition des conditions d'infection

En effet, une acclimatation des animaux dans la salle d'expérimentation, dans les mêmes conditions qu'en phase d'infection expérimentale, a été réalisée. Elle a été de 7 jours pour la première infection et de 6 jours pour la seconde. En condition d'infection, les 18 bacs de la salle contiennent 75 poissons par bac en moyenne. Chaque condition est évaluée en triplicat. Pendant l'acclimatation et la phase d'infection, les poissons sont maintenus en eau

stagnante. Deux purges quotidiennes correspondant à 80% du volume des bacs de 210L (environ 160L) permettent d'assurer un renouvellement de l'eau. Cela est imposé par le volume limité des cuves recevant l'eau des bacs qui doit être traitée au chlore avant toute évacuation des eaux usées. Un grillage recouvre le dessus de chacun des bacs de la salle d'expérimentation. La photopériode des poissons est également modifiée avec une luminosité de 6h à 22h, soit 16h par jour afin de faciliter le décompte et retrait des morts (pris toutes les 3h entre 6h et 22h). Les mesures du taux d'oxygène de l'eau ont été réalisées sur l'ensemble des bacs une fois par jour à l'aide d'une sonde OxyGuard International A / S. Juste avant les changements d'eau effectués deux fois par jour, les valeurs de taux d'oxygène de l'eau pouvaient descendre jusqu'à 65% pour la première infection expérimentale. La concentration en ammoniac libre/ion ammonium des bassins était évaluée par un test rapide colorimétrique sur un bac environ une fois par jour. Les résultats n'ont quasiment jamais été supérieurs à 1mg/L lors de la première infection.

2. Les résultats de la première infection expérimentale

a) Le suivi des mortalités de l'infection expérimentale

A la suite de l'infection des platax par balnéation, le décompte et le retrait des morts a été fait toutes les 3h entre 6h et 22h. L'infection expérimentale a duré 6 jours. Les mortalités étaient stabilisées à un très faible nombre d'animaux morts, c'est à dire ≤ 1 poisson mort par bac pour les 3 derniers prélèvements étalés sur 18h. Pour les bacs J (infection 3 souches) et R (vaccinés et infection 3 souches) uniquement, 2 poissons ont été retrouvés morts au cours des 3 derniers prélèvements.

Certains poissons symptomatiques et sains ont été prélevés au cours de l'infection expérimentale afin de réaliser des analyses diverses qui ne seront pas présentées dans ce travail. Le taux de prélèvement total de poissons vivants (animaux symptomatiques et sains considérés) n'a pas excédé 8,4% de l'effectif du bac, qui est la valeur la plus élevée obtenue pour le bac R.

A la fin de l'infection, un certain nombre de poissons dits « disparus » a été mis en évidence (Figure 54). Il s'agit de la différence entre l'effectif initial du bac avant l'infection et les prélèvements et relevés de mortalité opérés. L'hypothèse la plus probable est qu'il s'agirait de poissons morts qui auraient été évacués par la vanne de fond du bac. En effet, la plaque recouvrant l'ouverture de la vanne de fond n'étant pas fixe, les poissons morts déposés au fond du bacs auraient pu glisser dessous. Pour ces raisons, deux scénarii ont été testés afin

d'interpréter les résultats obtenus : le premier considère ces poissons « disparus » comme morts et le second les considère comme des poissons retirés de l'expérience. Le premier scénario est présenté dans ce travail, tandis que les résultats du second scénario se trouvent en annexe 7.

Les mortalités des poissons disparus pour le premier scénario ont été réparties proportionnellement aux taux de létalité observés pour chaque bac. C'est à dire que pour chaque temps de relevé de mortalité, le taux de létalité observé a été multiplié par un facteur, obtenu par le rapport du nombre de disparus sur le nombre de mort total du bac. Si la valeur était proche d'un nombre entier, ce chiffre était ajouté à la mortalité de ce temps.

Les résultats des mortalités observées pour l'expérimentation étudiant la virulence des souches des trois sérotypes et ceux de l'essai vaccinal sont présentés conjointement par la figure 54.

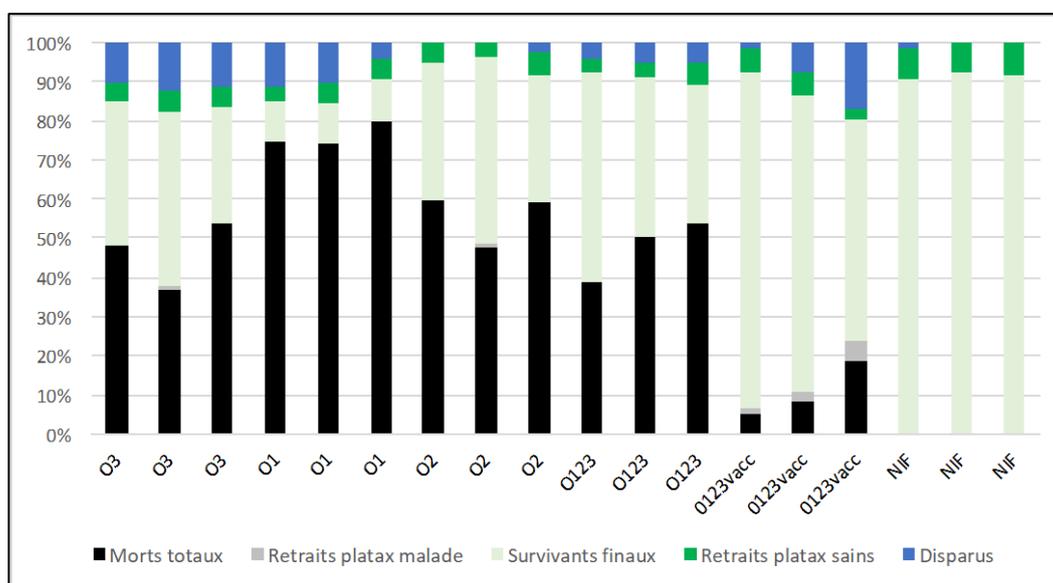


Figure 54 : Bilan des survies, mortalités, retraits et disparus de l'infection expérimentale n°1. Les platax de 42 jours sont infectés par trois souches 190605A03b (O1), 190115A05h (O2) et TFA4 (O3) de *Tenacibaculum maritimum*. Trois bacs sont infectés par un mélange des trois souches (O123) et trois autres par le même mélange après une vaccination par baignade (O123vacc) contre ces mêmes souches. Les témoins non infectés (NF) ont été mis en contact avec le milieu de culture stérile.

A première vue, on observe que les taux de létalité obtenus pour les bacs infectés par les souches de sérotype O3 (46,2% en moyenne pour les 3 bacs concernés) et de sérotype O2 (55,3%) sont similaires. Ils sont également proches de ceux obtenus lors de l'infection par les 3 sérotypes conjointement (47,7%). La souche de sérotype O1 semble être plus virulente que les autres souches car les taux de létalité obtenus sont bien supérieurs (76,2%). Enfin ceux obtenus pour les bacs des poissons vaccinés sont bien plus faibles. Ils sont compris entre 5,2%

et 19,4% avec une moyenne de 10,8% sur les 3 bacs concernés. Aucune mortalité n'a été observée dans les bacs des témoins non infectés.

b) Les courbes de survie de Kaplan-Meyer et les tests statistiques

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les six conditions évaluées lors de l'infection expérimentale 1, un test statistique du χ^2 a été effectué (2 degrés de liberté et risque $\alpha=0,05$) pour vérifier l'homogénéité des résultats des 3 bacs d'une même condition (Tableau 20). Les six conditions évoquées sont l'infection par la souche 190605A03b (O1), 190115A05h (O2), TFA4 (O3), les trois souches conjointement, les témoins non infectés et les poissons vaccinés et infectés par un mélange des trois souches. On teste l'hypothèse selon laquelle les résultats des bacs d'une même condition sont significativement différents. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 20 ci-dessous :

Tableau 20 : Evaluation de l'homogénéité des résultats obtenus pour les trois bacs d'une même condition.

Bacs	ABC (O3)	DEF (O1)	GHI (O2)	JKL (3 souches)	MNO (Témoins)	PQR (Vaccinés)
p-value	0,2	0,1	0,2	0,07	/	2e-06

On observe que l'hypothèse est rejetée ($p\text{-value} > 0,05$) pour l'ensemble des conditions, hormis pour les bacs des poissons vaccinés par balnéation puis infectés par un mélange des trois souches. Il s'agit donc de la seule condition pour laquelle les résultats obtenus pour les trois bacs ne sont pas homogènes. Cela suggère qu'un composant du bac, un intervenant, un acte ou un autre élément intervient de façon significative pour induire des différences dans les mortalités observées entre les bacs. Toutefois, l'acte de la vaccination ayant été rigoureusement identique pour les trois bacs (protocole, manipulateur, conditions identiques), il n'est vraisemblablement pas en cause. Ainsi le choix a été fait de poursuivre la comparaison des conditions. Il a été vérifié que le bac R est le seul mis en cause car la p-value obtenue lors de la comparaison des bacs P et Q entre eux est de 0,6 (soit strictement supérieur à 0,05).

Les courbes de survie de Kaplan-Meyer obtenues pour chacun des bacs sont répertoriées en annexe 6. La figure 55 présente les courbes de survies de Kaplan-Meyer des conditions d'infection par les trois sérotypes individuellement et conjointement, ainsi que les témoins non infectés.

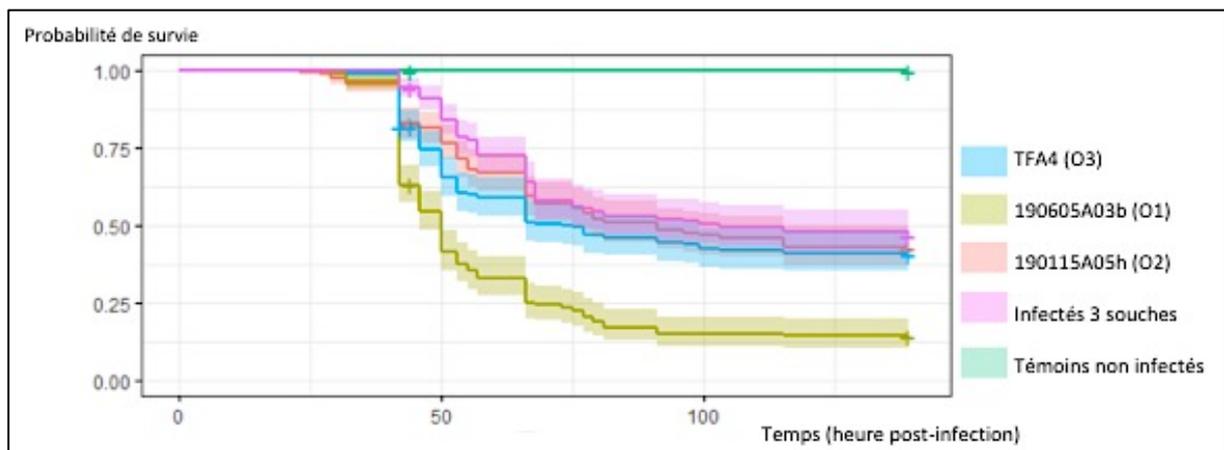


Figure 55 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des platax des conditions de l'infection expérimentale 1: Souche O1, O2, O3, mélange 3 souches et témoins non infectés (scenario 1).

Un test statistique du log-rank (Tableau 21) a été exécuté afin de déterminer si les différences et similitudes observées sont significatives. Les résultats obtenus confirment les observations faites lors du suivi des mortalités qui est représenté par la figure 54. C'est à dire que statistiquement la probabilité de survie lors d'une infection par le sérotype O1 est significativement plus faible que toutes les autres conditions. De plus, les probabilités de survie des platax infectés par la souche de sérotype O2 et ceux infectés par le sérotype O3 sont similaires. De même, lors d'une infection par le sérotype O2 la probabilité de survie est similaire à celle d'une infection par le mélange des trois sérotypes. Toutefois, il existe une différence significative ($p\text{-value} < 0,05$) entre les probabilités de survie des poissons infectés par la souche TFA4 (O3) et par ceux infectés par le mélange des trois souches. En outre, le taux de létalité cumulée moyen des trois bacs de la condition, est plus important pour la souche TFA4 de sérotype O3 (57,6%) que pour le mélange des trois souches (52,2%).

Tableau 21 : Test du log-rank indiquant les différences significatives ou non entre les courbes de survie de Kaplan-Meier des 6 conditions évaluées (souche O1, O2, O3, mélange 3 souches, vaccinés et infectés 3 souches et non infectés) dans le cadre du scenario 1.

Log-Rank test (P-value)	190115A05h (O2)	190605A03b (O1)	Non infectés	TFA4 (O3)	Infectés 3 souches
190605A03b (O1)	3.0e-15	-	-	-	-
Non infectés	< 2e-16	< 2e-16	-	-	-
TFA4 (O3)	0.394	3.2e-12	< 2e-16	-	-
Infectés 3 souches	0.228	< 2e-16	< 2e-16	0.028	-
Vaccinés et infectés 3 souches	2.0e-15	< 2e-16	9.5e-14	< 2e-16	2.8e-12

Les courbes de survie de Kaplan-Meier de l'essai vaccinal sont représentées par la figure 56. Cette dernière rassemble les conditions des témoins non infectés, de l'infection par le mélange des trois sérotypes et des poissons vaccinés par balnéation et infectés par les trois sérotypes.

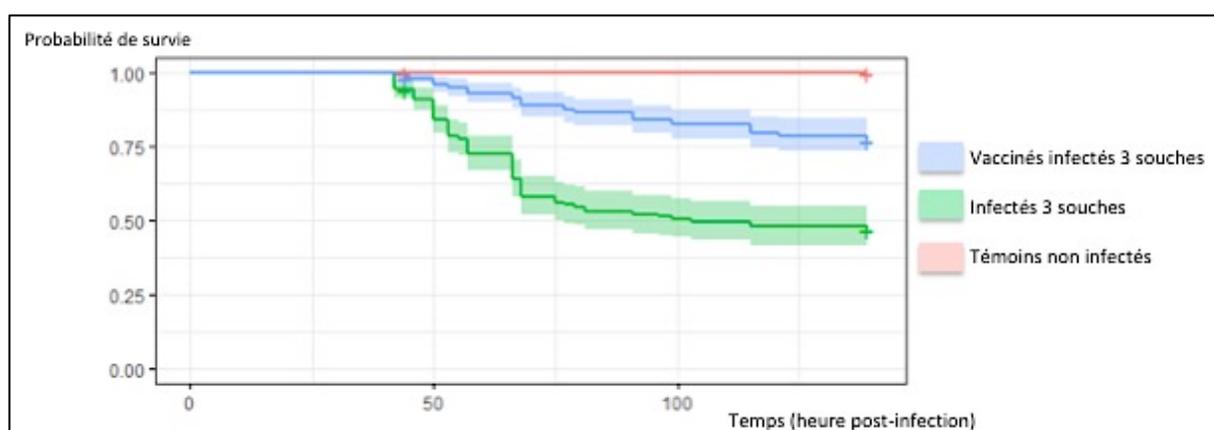


Figure 56 : Courbes de survie de Kaplan-Meier des platex des conditions de l'infection expérimentale 1: témoins non infectés, infectés 3 souches et vaccinés et infectés 3 souches (scenario 1).

Le tableau 21 confirme qu'il existe une différence significative entre les trois courbes de probabilité de survie de Kaplan-Meier de la figure 56. Cela confirme que, dans le cadre de notre étude, la vaccination par balnéation a permis d'améliorer significativement les probabilités de survie des poissons vaccinés par comparaison au lot de poisson non vaccinés ayant également été infecté par un mélange des trois sérotypes. On obtient un taux de survie estimé à environ 75% pour les poissons vaccinés à l'issue de l'expérience tandis qu'il est inférieur à 50% pour les poissons infectés par le mélange des trois souches.

Le rapport de hasard du modèle de Cox obtenu entre les conditions des poissons vaccinés puis infectés et des poissons infectés par le mélange trois souches indique une valeur de 3,1 [2,2 -4,3] dans le cadre de ce scénario 1. Cela signifie que les poissons vaccinés ont environ 3 fois moins de risque de mourir que les poissons non vaccinés et infectés par la même suspension bactérienne.

Avec le scénario 2, considérant les poissons disparus comme des retraits et présenté en annexe 7 selon la même méthodologie que le scénario 1, il est obtenu que les poissons vaccinés ont 4,4 [3 - 6,6] fois plus de chance de survie que les poissons non vaccinés et infectés par le mélange des trois souches de *Tenacibaculum maritimum*.

3. Discussion et Perspectives d'études

- Discussion du protocole et des résultats de l'étude

L'infection expérimentale dont les résultats ont été présentés a permis de mettre en évidence que les trois souches locales des sérotypes O1, O2 et O3 sont virulentes et induisent un taux de létalité conséquent. Il a été constaté que la souche de sérotype O1 (190605A03b) est significativement plus virulente que les souches de sérotype O2 (190115A05h) et de sérotype O3 (TFA4). Il serait intéressant d'étudier la virulence d'autres souches de sérotype O1 afin d'étudier si elle est effectivement associée au sérotype.

Par ailleurs, des différences de virulence ayant été observées entre les souches des trois sérotypes, il faudrait dans un premier temps confirmer par un sérotypage conventionnel que les souches 190605A03b (O1) et 190115A05h (O2) appartiennent bien au sérotype qui a été identifié à partir de l'analyse du génome. Le sérotypage conventionnel n'a été fait à ce jour que pour la souche TFA4 qui est de sérotype O3. Ensuite, il serait intéressant d'identifier d'un point de vue génétique et transcriptomique s'il existe des gènes susceptibles d'être impliqués dans des mécanismes de virulence qui ne seraient présents que chez les souches de sérotype O1 ou qui seraient davantage exprimés pour celles-ci. Il s'agit en effet de la souche pour laquelle la probabilité de survie des animaux était significativement plus faible dans ce travail.

Les faibles mortalités constatées pour les platax ayant reçu uniquement la première étape de vaccination par balnéation à 32 jours d'âge sont très satisfaisantes. On obtient un effet protecteur significatif de ces poissons par comparaison aux poissons non vaccinés ayant été infectés avec le même mélange de bactéries (O1 + O2 + O3). Néanmoins, un problème zootechnique a conduit à la disparition d'un certain nombre de poissons ce qui complique

l'interprétation des résultats. Deux scénarii ont ainsi été proposés, le premier considérant les platax « disparus » comme morts (résultats présentés dans le corps du texte), qui est l'hypothèse la plus pénalisante du point de vue du test d'évaluation vaccinale, et le second considérant ces mêmes poissons comme des retraits (résultats en annexe 7). Pour le scénario 2, les résultats de l'essai vaccinal sont encore plus significatifs que ceux présentés dans le scénario 1 ce qui confirme l'intérêt de poursuivre les études sur la vaccination du platax contre la ténacibaculose. Il serait tout de même important de procéder à des expérimentations similaires en s'affranchissant de ce problème, afin d'obtenir des données rigoureuses. De la même façon, il est nécessaire d'identifier et d'éliminer le paramètre à l'origine de la disparité des résultats constatées pour le bac R (poissons vaccinés) par rapport aux bacs P et Q. Si les mortalités du bac R sont bien significativement plus importantes en raison d'un paramètre autre que le bain vaccinal, les résultats de l'effet protecteur de la balnéation pourraient être encore plus satisfaisants que ceux présentés.

Par ailleurs, l'efficacité de la suspension vaccinale est prometteuse et son innocuité est aussi très satisfaisante car aucune mortalité n'a été observée pendant la phase d'acclimatation des poissons (6 jours) suite au bain vaccinal. En revanche, la suspension vaccinale par injection a induit une mortalité conséquente (275 poissons soit 50%) dans les 7 jours post-injection. La plupart des poissons sont décédés dans les premières minutes et heures suivant l'injection. Il est essentiel de modifier la composition de la suspension vaccinale afin d'obtenir une meilleure innocuité. La première hypothèse est que la concentration en bactérie de la suspension (1.10^9 bactéries/mL) est trop importante. Néanmoins le choix d'une telle concentration a été fait à partir de données publiées par la communauté scientifique. En effet l'équipe de Van Guelderen avait obtenu des résultats très satisfaisants en Tasmanie pour la mise au point d'un vaccin par injection intrapéritonéale contre la ténacibaculose pour les salmonidés d'élevage (R. van Gelderen et al. 2009). Dans cette étude, l'injection vaccinale contenait 1.8×10^9 cellules/0.1mL d'inoculum. Le vaccin FM95 commercialisé en Espagne quant à lui est constitué d'une suspension bactérienne de *Tenacibaculum maritimum* contenant 10^{10} cellules/mL (Santos Rodriguez, Pazos Alvarez 2000). Néanmoins, les souches utilisées dans ces suspensions vaccinales ne sont pas les mêmes et proviennent de régions du monde très différentes. Ainsi, cela peut expliquer que lors de l'élaboration d'un protocole à partir de nouvelles souches, les réactions des poissons à la nouvelle suspension vaccinale ne sont pas celles attendues.

Afin de tenter d'identifier l'ingrédient ou les ingrédients de la suspension vaccinale responsables des mortalités observées, une expérimentation rapide a été menée. Vingt-sept

platax du même lot que ceux produits pour l'expérience et ayant été élevés dans les mêmes conditions ont été utilisés. Il s'agit toutefois de platax n'ayant pas reçu la première vaccination par balnéation. Trois conditions ont été évaluées, à savoir l'injection intrapéritonéale d'un volume de 0,05mL d'une émulsion contenant 20% d'adjuvant MONTANIDE Gel 02 dilué dans du PBS, d'une suspension contenant le milieu de culture des bactéries (centrifugé en culot et resuspendu dans du PBS), et d'une suspension contenant la souche bactérienne TFA4 (O3) à la concentration de 1.10^9 bactéries/mL. Neuf poissons ont été utilisés pour chacune des trois conditions décrites, mis en place dans des seaux de 5L et les mortalités ont été relevées 15h après l'injection. Ce test a permis d'observer la mortalité de 3/9 poissons ayant reçu l'injection de l'émulsion d'adjuvant, 1/9 platax ayant reçu l'injection de la suspension du milieu de culture stérile et 5/9 animaux ayant reçu l'injection de la souche TFA4 (O3). Il apparaît que la concentration en antigène est le paramètre le plus susceptible d'être responsable des mortalités observées même s'il reste impossible d'exclure complètement les deux autres paramètres étant donné que des mortalités ont tout de même été observées sur des poissons de ces conditions et que le test a été réalisé sur un faible effectif. Il est relativement surprenant d'avoir observé une mortalité pour 3 poissons ayant reçu l'émulsion d'adjuvant, cependant pour conclure il faudrait reconduire le test avec un plus grand effectif et des conditions contrôlées. Bien que très utilisé en aquaculture sous forme de solutions de balnéation thérapeutiques, le formaldéhyde est une molécule toxique pouvant induire un taux de 100% de mortalité s'il est utilisé à très forte dose (Andrade-Porto et al. 2018). Bien que trois rinçages des cellules de *T. maritimum* aient été effectués avec du PBS stérile lors de la préparation des suspensions vaccinales, il peut être envisagé que la mortalité des poissons soit le fait de la présence de formaldéhyde résiduel dans la suspension vaccinale ayant été injectée.

- Autres perspectives de recherche pour l'essai vaccinal

Afin de poursuivre la recherche sur l'élaboration d'un protocole vaccinal contre la ténacibaculose pour les *Platax orbicularis* d'élevage en Polynésie, il serait intéressant de vérifier si la protection vaccinale des poissons est satisfaisante en milieu naturel pendant la phase de pré-grossissement. Pour cela les données de l'infection naturelle décrite permettront d'obtenir des premiers éléments de réponse prochainement. Dans un premier temps il pourrait être envisagé de vérifier par une infection expérimentale plus tardive (quelques mois après la vaccination par exemple) si la protection immunitaire conférée par le vaccin persiste pendant un temps suffisant, à savoir pour protéger les animaux entre la mise en cage des poissons et

jusqu'à 4 mois d'âge (âge approximatif ou un phénomène de résistance à la maladie est observé en élevage).

Ensuite, l'innocuité de la suspension vaccinale par injection n'étant pas satisfaisante et l'acte d'injection nécessitant une main d'œuvre et un temps relativement conséquent pour le nombre important de platax constituant les lots d'élevage, l'élaboration d'un protocole vaccinal mettant en jeu uniquement des vaccinations par balnéation serait idéale. Pour ce travail, le choix d'effectuer un rappel par injection a été fait car la littérature scientifique ne permettait pas d'obtenir des informations sur la vaccination par balnéation contre la ténacibaculose. Les objectifs de l'élaboration d'un protocole vaccinal sont une bonne efficacité et innocuité, mais aussi le fait de correspondre au mieux aux contraintes de la filière, à savoir transférer les poissons en milieu ouvert non bio-sécurisé à un poids d'au maximum 10 g. Ainsi il faudrait un protocole vaccinal le moins coûteux et contraignant possible pouvant être finalisé et conférant une protection satisfaisante avant que le poids des platax atteigne 10 g. Afin d'améliorer l'innocuité de la suspension vaccinale par injection, il peut également être envisagé de procéder à trois vaccinations monovalentes distinctes, c'est à dire vacciner contre les trois sérotypes par des injections à un intervalle de 14 jours par exemple.

Autrement, il serait intéressant d'évaluer si la protection immunitaire, conférée par les suspensions vaccinales administrées, est bien obtenue vis à vis de chaque sérotype et si elle l'est dans la même mesure. De surcroit, tester l'efficacité vaccinale vis à vis d'autres souches des sérotypes O1, O2 et O3 serait primordiale.

CONCLUSION

L'étude des communautés bactériennes détectées sur le tégument des platax en condition d'infection naturelle a confirmé la présence en abondance de bactéries du genre *Tenacibaculum*. Elle a également mis en lumière que les communautés prélevées dans les environnements d'élevage des fermes piscicoles de Taha'a et Toahotu semblent très différentes. Il n'a cependant pas été possible d'identifier des communautés particulières dans le microbiote tégumentaire des platax asymptomatiques pouvant leur conférer une certaine protection. Les connaissances acquises ont permis de réfuter l'hypothèse d'une co-infection par l'agent *Vibrio harveyi* localement, lors des deux épisodes de ténacibaculose analysés. Par ailleurs, la mise au point d'une PCR quantitative de sérotypage a également permis de mettre en évidence que les trois sérotypes (O1, O2 et O3) présents en Polynésie étaient très souvent détectés conjointement et en quantité importante lors des infections naturelles. Au cours des deux épisodes infectieux étudiés, les sérotypes O1 et O2 ont été retrouvés très majoritairement sur la ferme de Taha'a tandis que les sérotypes O1 et O3 prédominent largement sur le site de Toahotu. Cette observation a mis en évidence la nécessité de rechercher à conférer aux *Platax orbicularis* d'élevage une protection contre les trois sérotypes détectés en Polynésie française (O1, O2 et O3). La recherche d'une solution éco-responsable durable a été orientée vers la mise en place d'un protocole vaccinal. La virulence de trois souches locales appartenant aux sérotypes O1, O2 et O3 (d'après un typage moléculaire), a été étudiée par infection expérimentale, ce qui a confirmé la nécessité d'une immunité trivalente. Un protocole vaccinal a été envisagé à partir de deux modalités vaccinales, la balnéation et l'injection vaccinale. Les résultats de la première étape du protocole, soit une vaccination par balnéation, a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants. Néanmoins, l'innocuité de la suspension vaccinale par injection nécessite d'être améliorée. Les perspectives de recherche pourraient s'orienter vers un protocole fondé exclusivement sur des administrations par bains vaccinaux, ce qui serait en adéquation avec les contraintes de la filière (lots de plusieurs milliers de poissons, main d'œuvre nécessaire, protocole vaccinal complet avant le transfert des animaux en milieu ouvert dans les cages lagunaires).

BIBLIOGRAPHIE

- ABDELAZIZ ABDEL GALIL, M. et HASHEM, M., 2012. Epidemiological and bacteriological studies on tenacibaculosis in some Red Sea fishes, Egypt. In : *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING (IJESE)*. 2012. Vol. Vol 3, pp. 25-32.
- ALMEIDA, A.R., TACÃO, M., MACHADO, A.L., GOLOVKO, O., ZLABEK, V., I. DOMINGUES et HENRIQUES, I., 2019. Long-term effects of oxytetracycline exposure in zebrafish: A multi-level perspective. In : *Chemosphere*. mai 2019. Vol. 222, pp. 333-344. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.01.147.
- ALSINA, M. et BLANCH, A. R., 1993. First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). In : *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1993. Vol. 13, n° 5, pp. 157-160.
- ANACKER, R.L. et ORDAL, E.J., 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. In : *Department of Microbiology, University of Washington, Seattle, Washinyton*. 1959.
- ANDRADE-PORTO, S. M., RAMOS, C. A., ROQUE, R., AFFONSO, E. G., BARCELLOS, José F. M., QUEIROZ, M. N., ARAÚJO, C. S. O. et TAVARES-DIAS, M., 2018. Histopathological evaluation of formalin toxicity in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. In : *Pesquisa Veterinária Brasileira*. juin 2018. Vol. 38, pp. 1015-1025. DOI 10.1590/1678-5150-PVB-5106.
- AUSTIN, B. et ZHANG, X.-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. In : *Letters in Applied Microbiology*. août 2006. Vol. 43, n° 2, pp. 119-124. DOI 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., 2005. *Avances en el conocimiento del patógeno de peces Tenacibaculum maritimum: Implicaciones en el diagnóstico y prevención de la enfermedad*. 2005. S.l. : s.n.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., COLLARTE, C., SILDARRIAGA-CÓRDOBA, M. et IRGANG, R., 2020. New salmonid hosts for *Tenacibaculum* species: Expansion of tenacibaculosis in Chilean aquaculture. In : *Journal of Fish Diseases*. 2020. Vol. 43, n° 9, pp. 1077-1085. DOI 10.1111/jfd.13213.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., IRGANG, R., MAGARIÑOS, B., ROMALDE, J. et TORANZO, A., 2006a. Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. In : *Environmental Microbiology*. 2006a. Vol. 8, n° 5, pp. 921-928. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00981.x.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., IRGANG, R., NÚÑEZ, S., ROMALDE, J. et TORANZO, A., 2005. Recommendation of an Appropriate Medium for In Vitro Drug Susceptibility Testing of the Fish Pathogen *Tenacibaculum maritimum*. In : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. janvier 2005. Vol. 49, n° 1, pp. 82-87. DOI 10.1128/AAC.49.1.82-87.2005.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., IRGANG, R., SANDOVAL, C., MORENO-LIRA, P., HOUEL, A., DUCHAUD, E., POBLETE-MORALES, M., NICOLAS, P. et ILARDI, P., 2016. Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016. Vol. 63, n° 2, pp. 121-126. DOI 10.1111/tbed.12464.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., MAGARIÑOS, B., LÓPEZ-ROMALDE, S., ROMALDE, J. et TORANZO, A., 2004a. Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 2004a. Vol. 58, n° 1, pp. 1-8. DOI 10.3354/dao058001.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., MAGARINOS, B., MORINIGO, M., ROMALDE, J. et TORANZO, A., 2005. A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). In : *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 1 janvier 2005. Vol. 25.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., MAGARIÑOS, B., TORANZO, A., BEAZ, R. et ROMALDE, J., 2004b. Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection.

- In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 2004b. Vol. 62, n° 1-2, pp. 75-83. DOI 10.3354/dao062075.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., NUNEZ, S., BARJA, J. et TORANZO, A., 2008. Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. In : *Aquaculture International*. 1 février 2008. Vol. 16, pp. 1-11. DOI 10.1007/s10499-007-9117-y.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., RODRÍGUEZ, J., MAGARIÑOS, B., ROMALDE, J. et TORANZO, A., 2004c. Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. In : *Journal of Applied Microbiology*. 2004c. Vol. 96, n° 4, pp. 871-877. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02217.x.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., TORANZO, A. et MAGARINOS, B., 2006b. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. In : *Diseases of aquatic organisms*. 2006b. Vol. 71, pp. 255-66. DOI 10.3354/dao071255.
- BADER, J. et SHOTTS, E., 1998. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* Species by Species-Specific Polymerase Chain Reaction Primers to the 16S Ribosomal RNA Gene. In : *Journal of Aquatic Animal Health*. 1998. Vol. 10, n° 4, pp. 311-319. DOI 10.1577/1548-8667(1998)010<0311:IOFAFS>2.0.CO;2.
- BARROS, B., SAKAI, Y., HASHIMOTO, H. et GUSHIMA, K., 2008. Feeding behavior of leaf-like juveniles of the round batfish *Platax orbicularis* (Ephippidae) on reefs of Kuchierabu-jima Island, southern Japan. In : *Journal of Ethology*. 1 mai 2008. Vol. 26, pp. 287-293. DOI 10.1007/s10164-007-0066-8.
- BAXA, D., 1988a. In vitro and in vivo activities of *Flexibacter maritimus* toxins. In : *In vitro and in vivo activities of Flexibacter maritimus* toxins. 1988a.
- BAXA, D., KAWAI, K. et KUSUDA, R., 1987. Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) fry. In : *Fish Pathology*. 1 janvier 1987. Vol. 22, pp. 105-109. DOI 10.3147/jsfp.22.105.
- BAXA, D., KAWAI, K. et KUSUDA, R., 1988. Detection of *Flexibacter maritimus* by Fluorescent Antibody Technique in Experimentally Infected Black Sea Bream Fry. In : *Fish Pathology*. 1 janvier 1988. Vol. 23. DOI 10.3147/jsfp.23.29.
- BERNARDET, J. et GRIMONT, P., 1989. Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. In : . 1989. DOI 10.1099/00207713-39-3-346.
- BERNARDET, J-F, CAMPBELL, A-C et BUSWELL, J., 1990. *Flexibacter maritimus* is the agent of « black patch necrosis » in Dover sole in Scotland. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 1990. Vol. 8, pp. 233-237. DOI 10.3354/dao008233.
- BERNARDET, J-F, KEROUAULT, B. et MICHEL, C., 1994. Comparative Study on *Flexibacter maritimus* Strains Isolated from Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. In : *Fish Pathology*. 1 janvier 1994. Vol. 29, pp. 105-111. DOI 10.3147/jsfp.29.105.
- BLY, J. E., CUCHENS, M. A. et CLEM, L. W., 1988. Temperature mediated processes in teleost immunity: differential abilities of channel catfish T and B lymphocytes to cap membrane antigen. In : *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*. 1988. Vol. 90, n° 1, pp. 103-107. DOI 10.1016/0300-9629(88)91012-2.
- BLY, Jan E. et WILLIAM CLEM, L., 1991. Temperature-mediated processes in teleost immunity: In vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1 juillet 1991. Vol. 28, n° 3, pp. 365-377. DOI 10.1016/0165-2427(91)90127-X.
- BOICHARD, S., 2008. *La synchronisation des pontes chez Platax orbicularis BOICHARD, sylvestre*. S.I.
- BOUDINOT, P. et DORSON, M., 2018. Éléments d'immunologie des poisons. In : [en ligne]. 2018. DOI 10.15454/1.533213541149917E12. Disponible à l'adresse : <https://hal.inrae.fr/hal-02790940>.

- BRENNER, D. J., MCWHORTER, A. C., KNUTSON, J. K. et STEIGERWALT, A. G., 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. In : *Journal of Clinical Microbiology*. juin 1982. Vol. 15, n° 6, pp. 1133-1140. DOI 10.1128/jcm.15.6.1133-1140.1982.
- BRIDEL, S., 2020. *Développement d'outils bio-informatiques décisionnels en médecine vétérinaire : application au modèle Tenacibaculum, agent pathogène de poissons marins* [en ligne]. phdthesis. S.l. : Université Paris-Saclay. Disponible à l'adresse : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02971847>.
- BRIDEL, S., BOURGEON, F., MARIE, A., SAULNIER, D., PASEK, S., NICOLAS, P., BERNARDET, J-F. et DUCHAUD, E., 2020. Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: from genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing. In : *Veterinary Research*. décembre 2020. Vol. 51, n° 1, pp. 1-17. DOI 10.1186/s13567-020-00782-0.
- BROSNAHAN, C. L., GEORGIADIS, E., MCDONALD, C., KEELING, S. E., MUNDAY, J. S. et JONES, B., 2019. Optimisation and validation of a PCR to detect viable *Tenacibaculum maritimum* in salmon skin tissue samples. In : *Journal of Microbiological Methods*. avril 2019. Vol. 159, pp. 186-193. DOI 10.1016/j.mimet.2019.03.008.
- BURIOLI, E. a. V., VARELLO, K., TRANCART, S., BOZZETTA, E., GORLA, A., PREARO, M. et HOUSSIN, M., 2018. First description of a mortality event in adult Pacific oysters in Italy associated with infection by a *Tenacibaculum soleae* strain. In : *Journal of Fish Diseases*. février 2018. Vol. 41, n° 2, pp. 215-221. DOI 10.1111/jfd.12698.
- CABELLO, F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. In : *Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 8, n° 7, pp. 1137-1144. DOI 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.
- CAMPBELL, A. C. et BUSWELL, J. A., 1982. An investigation into the bacterial aetiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. In : *Journal of Fish Diseases*. 1982. Vol. 5, n° 6, pp. 495-508. DOI 10.1111/j.1365-2761.1982.tb00509.x.
- CASTRO, N, MAGARIFIOS, B, NUNEZ, S et TORANZO, A E, 2007. Reassessment of the *Tenacibaculum maritimum* serotypes causing mortalities in cultured marine fish. In : . 2007. pp. 5.
- CASTRO, R., JOUNEAU, L., TACCHI, L., MACQUEEN, D., ALZAID, Abdullah, SECOMBES, C., MARTIN, S. et BOUDINOT, P., 2015. Disparate developmental patterns of immune responses to bacterial and viral infections in fish. In : *Scientific Reports*. 7 décembre 2015. Vol. 5, n° 1, pp. 15458. DOI 10.1038/srep15458.
- CEPEDA, C, GARCÍA-MÁRQUEZ, S et SANTOS, Y., 2003. Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. In : *Journal of fish diseases*. 1 mars 2003. Vol. 26, pp. 65-70. DOI 10.1046/j.1365-2761.2003.00431.x.
- CHEN, M. E., HENRY-FORD, D. et GROFF, J. M., 1995. Isolation and Characterization of *Flexibacter maritimus* from Marine Fishes of California. In : *Journal of Aquatic Animal Health*. 1995. Vol. 7, n° 4, pp. 318-326. DOI 10.1577/1548-8667(1995)007<0318:IACOMF>2.3.CO;2.
- CLEM, L. W., FAULMANN, E., MILLER, N. W., ELLSAESSER, C., LOBB, C. J. et CUCHENS, M. A., 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of in vitro and in vivo temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. In : *Developmental and Comparative Immunology*. 1984. Vol. 8, n° 2, pp. 313-322. DOI 10.1016/0145-305x(84)90038-7.
- DAVID, R., TREGUIER, C., MONTAGNANI, C., BELLIARD, C., LEVY P., NEDELEC G., JOUFOQUES V., REMOISSENET, G., GUEGUEN, Y. et COCHENNEC, N., 2010. Molecular detection of betanodavirus from the farmed fish, *Platax orbicularis* (Forsskal) (Ephippidae), in French Polynesia. In : *Journal Of Fish Diseases (0140-7775) (Wiley-blackwell Publishing, Inc), 2010-05 , Vol. 33 , N. 5 , P. 451-454*. 12 février 2010. Vol. 33. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01136.x.
- DAVID, R., VAN CAM, A., SOUPÉ, M-E. et COCHENNEC-LAUREAU, N., 2008. *Rapport final de la*

convention N° 7.0022 du 23 mai 2007 « Prophylaxie des poissons lagunaires en élevage ». décembre 2008. S.l. : s.n.

DELANNOY, C., HOUGHTON, J., FLEMING, N. et FERGUSON, H., 2011. Mauve Stingers (*Pelagia noctiluca*) as carriers of the bacterial fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. In : *Aquaculture*. 3 février 2011. Vol. 311, n° 1, pp. 255-257. DOI 10.1016/j.aquaculture.2010.11.033.

DEVESA, S., BARJA, J. et TORANZO, A., 2006. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). In : *Journal of Fish Diseases*. 7 avril 2006. Vol. 12, pp. 323-333. DOI 10.1111/j.1365-2761.1989.tb00321.x.

DIRECTION DE LA BIOSÉCURITÉ et MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE VERTE ET DU DOMAINE EN CHARGE DES MINES ET DE LA RECHERCHE POLYNÉSIE FRANÇAISE, 2020. *Guide relatif au bien-être des animaux d'aquaculture en Polynésie française*. Section aquaculture - Division pêche, aquaculture et écosystèmes marins Communauté du Pacifique. Nouméa, Nouvelle Calédonie.

DIRECTION DES RESSOURCES MARINES, 2019. *Bulletin statistique: Synthèse des données de la pêche professionnelle, de l'aquaculture et de l'apiculture*. 2019. S.l. : s.n.

FAÍLDE, L. D., BERMÚDEZ, R., LOSADA, A. P., RIAZA, A., SANTOS, Y. et QUIROGA, M. I., 2014. Immunohistochemical diagnosis of tenacibaculosis in paraffin-embedded tissues of Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858. In : *Journal of Fish Diseases*. 2014. Vol. 37, n° 11, pp. 959-968. DOI 10.1111/jfd.12199.

FAÍLDE, L. D., LOSADA, A. P., BERMÚDEZ, R., SANTOS, Y. et QUIROGA, M. I., 2013. *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). In : *Microbial Pathogenesis*. 1 décembre 2013. Vol. 65, pp. 82-88. DOI 10.1016/j.micpath.2013.09.003.

FALENTIN, H., AUER, L., MARIADASSOU, M., PASCAL, G., RUÉ, Olivier, DUGAT-BONY, E., DELBES, C., NICOLAS, A., RIFA, E., MONDY, S., BOULCH, M., CAUQUIL, L., RAQUET, G. H., TERRAT, S. et ABRAHAM, A-L., 2019. Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding. In : . 2019. pp. 24.

FERGUSON, H. W., M. J. DELANNOY C., HAY, S., NICOLSON, J., SUTHERLAND, D. et CRUMLISH, M., 2010. Jellyfish as Vectors of Bacterial Disease for Farmed Salmon (*Salmo Salar*). In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1 mai 2010. Vol. 22, n° 3, pp. 376-382. DOI 10.1177/104063871002200305.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C., F. GONZÁLEZ, S. et SANTOS, Y., 2019. Quantitative PCR coupled with melting curve analysis for rapid detection and quantification of *Tenacibaculum maritimum* in fish and environmental samples. In : *Aquaculture*. 1 janvier 2019. Vol. 498, pp. 289-296. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.08.039.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C. et SANTOS, Y., 2018. Identification and typing of fish pathogenic species of the genus *Tenacibaculum*. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. décembre 2018. Vol. 102, n° 23, pp. 9973-9989. DOI 10.1007/s00253-018-9370-1.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, C., TORRES-CORRAL, Y., SALTOS-ROSETO, N. et SANTOS, Y., 2017. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid differentiation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. juillet 2017. Vol. 101, n° 13, pp. 5377-5390. DOI 10.1007/s00253-017-8324-3.

FRINGUELLI, E., SAVAGE, P. D., GORDON, A., BAXTER, E. J., RODGER, H. D. et GRAHAM, D. A., 2012. Development of a quantitative real-time PCR for the detection of *Tenacibaculum maritimum* and its application to field samples. In : *Journal of Fish Diseases*. août 2012. Vol. 35, n° 8, pp. 579-590. DOI 10.1111/j.1365-2761.2012.01377.x.

FRISCH, K., SMÅGE, S. B., JOHANSEN, R., DUESUND, H., BREVIK, Ø. J. et NYLUND, A., 2018b. Pathology of experimentally induced mouthrot caused by *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon smolts. In : *PLOS ONE*. 2018b. Vol. 13, n° 11, pp. e0206951. DOI 10.1371/journal.pone.0206951.

- FRISCH, K., SMÅGE, S., BREVIK, Ø. J., DUESUND, H. et NYLUND, A., 2017. Genotyping of *Tenacibaculum maritimum* isolates from farmed Atlantic salmon in Western Canada. In : *Journal of Fish Diseases*. 26 juillet 2017. Vol. 41. DOI 10.1111/jfd.12687.
- FRISCH, Kathleen, SMÅGE, S. B., VALLESTAD, C., DUESUND, H., BREVIK, Ø J., KLEVAN, A., OLSEN, R. H., SJAATIL, S. T., GAUTHIER, D., BRUDESETH, B. et NYLUND, A., 2018a. Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. In : *Journal of Fish Diseases*. 2018a. Vol. 41, n° 8, pp. 1247-1258. DOI <https://doi.org/10.1111/jfd.12818>.
- GASSET, E., JOUFOQUES, V., DAVID, R., MAAMAATUAIAHUTAPU, M., TEISSIER, A., TAMATA, T. et DUPIEUX, S., 2009. Premiers résultats de sex-ratio, puberté et dimorphisme sexuel chez le Paraha peue (*Platax orbicularis*) en élevage. In : [en ligne]. 1 janvier 2009. Disponible à l'adresse : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00128/23878/>.
- GASSET, Eric et REMOISSENET, G., 2012. Le Paraha peue. *Platax orbicularis*: Biologie, pêche, aquaculture et marché. In : [en ligne]. 2012. Disponible à l'adresse : <https://www.abebooks.fr/paraha-peue-Platax-orbicularis-Biologie-p%C3%A0che/22765542063/bd>.
- GOMEZ-GIL, B., SOTO-RODRÍGUEZ, S., GARCÍA-GASCA, A., ROQUE, A., VAZQUEZ-JUAREZ, R., THOMPSON, F. L. et SWINGS, J., 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. In : *Microbiology (Reading, England)*. juin 2004. Vol. 150, n° Pt 6, pp. 1769-1777. DOI 10.1099/mic.0.26797-0.
- GROTHUSEN, H., CASTILLO, A., HENRÍQUEZ, P., NAVAS, E., BOHLE, H., ARAYA, C., BUSTAMANTE, F., BUSTOS, P. et MANCILLA, M., 2016. First Complete Genome Sequence of *Tenacibaculum dicentrarchi*, an Emerging Bacterial Pathogen of Salmonids. In : *Genome Announcements* [en ligne]. 18 février 2016. Vol. 4, n° 1. DOI 10.1128/genomeA.01756-15. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4759079/>.
- GUARDIOLA, F. A., MABROK, M., MACHADO, M., AZEREDO, R., AFONSO, A., ESTEBAN, M. A. et COSTAS, B., 2019. Mucosal and systemic immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) bath challenged with *Tenacibaculum maritimum*: A time-course study. In : *Fish & Shellfish Immunology*. 1 avril 2019. Vol. 87, pp. 744-754. DOI 10.1016/j.fsi.2019.02.015.
- HABIB, C., HOUEL, A., LUNAZZI, A., BERNARDET, J-F., OLSEN, A. B., NILSEN, H., TORANZO, A., CASTRO, N., NICOLAS, P. et DUCHAUD, E., 2014. Multilocus Sequence Analysis of the Marine Bacterial Genus *Tenacibaculum* Suggests Parallel Evolution of Fish Pathogenicity and Endemic Colonization of Aquaculture Systems. In : *Applied and Environmental Microbiology*. septembre 2014. Vol. 80, n° 17, pp. 5503-5514. DOI 10.1128/AEM.01177-14.
- HANDLINGER, J., SOLTANI, M. et PERCIVAL, S., 1997. The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. In : *Journal of Fish Diseases*. mai 1997. Vol. 20, n° 3, pp. 159-168. DOI 10.1046/j.1365-2761.1997.00288.x.
- HANSEN, G. H., BERGH, O., MICHAELSEN, J. et KNAPPSKOG, D., 1992. *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. In : *International Journal of Systematic Bacteriology*. juillet 1992. Vol. 42, n° 3, pp. 451-458. DOI 10.1099/00207713-42-3-451.
- IVANOVA, E., NG, H. J. et WEBB, H., 2014. The Family Pseudoalteromonadaceae. In : ROSENBERG, E., DELONG, E., LORY, S., STACKEBRANDT, E. et THOMPSON, F. (éd.), *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer. pp. 575-582. ISBN 978-3-642-38922-1. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_229.
- JOHNSON, K. A., FLYNN, J. K. et AMEND, D. F., 1982. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. In : *Journal of Fish Diseases*. 1982. Vol. 5, n° 3, pp. 197-205. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00474.x>.
- KARLSEN, C., OTTEM, K. F., BREVIK, Ø. J., DAVEY, M., SØRUM, H. et WINTHER-LARSEN, H. C.,

2017. The environmental and host-associated bacterial microbiota of Arctic seawater-farmed Atlantic salmon with ulcerative disorders. In : *Journal of Fish Diseases*. novembre 2017. Vol. 40, n° 11, pp. 1645-1663. DOI 10.1111/jfd.12632.
- KERRY, J., COYNE, R., GILROY, D., HINEY, M. et SMITH, P., 1996. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. In : *Aquaculture*. 15 octobre 1996. Vol. 145, n° 1, pp. 31-39. DOI 10.1016/S0044-8486(96)01353-1.
- KIMURA, H. et KUSUDA, R., 1983. Microbial Succession in Gliding Bacterium Infection in Red Sea Bream. In : *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1983. Vol. 49, n° 10, pp. 1553-1559. DOI 10.2331/suisan.49.1553.
- KOTOB, M., MENANTEAU-LEDOUBLE, S., KUMAR, G., ABDELZAHER, M. et EL-MATBOULI, M., 2016. The impact of co-infections on fish: a review. In : *Veterinary Research*. 4 octobre 2016. Vol. 47, n° 1, pp. 98. DOI 10.1186/s13567-016-0383-4.
- LE LUYER, J., SCHULL, Q., AUFFRET, P., LOPEZ, P., CRUSOT, Margaux, BELLIARD, C., BASSET, C., CARRADEC, Q., POULAIN, J., PLANES, S. et SAULNIER, D., 2020. *Dual RNAseq highlights the kinetics of skin microbiome and fish host responsiveness to bacterial infection* [en ligne]. preprint. S.l. In Review. [Disponible à l'adresse : <https://www.researchsquare.com/article/rs-83693/v1>].
- LE MARÉCHAL, B. et REMOISSENET, G., 2001. *Sélection de nouvelles espèces pour l'aquaculture en Polynésie française. Bilan des recherches bibliographiques*. 2001. S.l. : s.n. Rapport du Service de la Pêche (SPE), 27 p.
- LEVIPAN, H., TAPIA-CAMMAS, D., MOLINA, V., IRGANG, R., TORANZO, A., MAGARIÑOS, B. et AVENDAÑO-HERRERA, R., 2019. Biofilm development and cell viability: An undervalued mechanism in the persistence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. In : *Aquaculture*. 15 septembre 2019. Vol. 511, pp. 734267. DOI 10.1016/j.aquaculture.2019.734267.
- LÓPEZ, J. R., PIÑEIRO-VIDAL, M., GARCÍA-LAMAS, N., HERRAN, R. De La, NAVAS, J. I., HACHERO-CRUZADO, I. et SANTOS, Y., 2010. First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau), and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.). In : *Journal of Fish Diseases*. 2010. Vol. 33, n° 3, pp. 273-278. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01105.x.
- LOPEZ, P., SAULNIER, D., SWARUP-GAUCHER, S., DAVID, R., LAU, Christophe, TAPUTUARAI, R., BELLIARD, C., BASSET, C., LABRUNE, V., MARIE, A., BERNARDET, J-F. et DUCHAUD, E., 2021. First isolation of virulent *Tenacibaculum maritimum* strains from diseased orbicular batfish (*Platax orbicularis*) farmed in Tahiti Island. In : *bioRxiv*. 15 mars 2021. pp. 2021.03.15.435441. DOI 10.1101/2021.03.15.435441.
- LUJAN, K., EISEN, J. et COIL, D., 2016. Draft Genome Sequence of *Tenacibaculum soleae* UCD-KL19. In : *Genome Announcements* [en ligne]. 13 octobre 2016. Vol. 4, n° 5. DOI 10.1128/genomeA.01120-16. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5064108/>.
- MAAMAATUAIAHUTAPU, M., JOUFOQUES, V., TAMATA, T., DUPIEUX, S., TEISSIER, Alexandre, RARAHU, D., REMOISSENET, G., KNOCKAERT, C., GUEGUEN, Y. et COVÈS, D., 2008. Rapport final de la Convention N° 8.0020 du 25 septembre 2008 : "Maîtrise technique de la production de poissons lagunaires ". In : . 2008. pp. 204.
- MABROK, M, MACHADO, M, SERRA, C R, AFONSO, A, VALENTE, L M P et COSTAS, B, 2016. *Tenacibaculosis induction in the Senegalese sole (Solea senegalensis) and studies of Tenacibaculum maritimum survival against host mucus and plasma*. In : *Journal of Fish Diseases*. décembre 2016. Vol. 39, n° 12, pp. 1445-1455. DOI 10.1111/jfd.12483.
- MAGARIÑOS, B, PAZOS, F, SANTOS, Y, ROMALDE, JI et TORANZO, Ae, 1995. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 1995. Vol. 21, pp. 103-108. DOI 10.3354/dao021103.
- MASUDA, Y., TAJIMA, K. et EZURA, Y., 2004. Resuscitation of *Tenacibaculum* sp., the causative bacterium

of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, from the viable but non-culturable state. In : *Fisheries Science*. 16 mars 2004. Vol. 70, pp. 277-284. DOI 10.1111/j.1444-2906.2003.00801.x.

MASUMURA, K. et WAKABAYASHI, H., 1977. An Outbreak of Gliding Bacterial Disease in Hatchery-born Red Seabream (*Pagrus major*) and Gilthead (*Acanthopagrus schlegeli*) Fry in Hiroshima. In : *Fish Pathology*. 1977. Vol. 12, n° 3, pp. 171-177. DOI 10.3147/jsfp.12.171.

MAYER, C., ROMERO, M., MURAS, A. et OTERO, A., 2015. Aii20J, a wide-spectrum thermostable N-acylhomoserine lactonase from the marine bacterium *Tenacibaculum* sp. 20J, can quench AHL-mediated acid resistance in *Escherichia coli*. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. novembre 2015. Vol. 99, n° 22, pp. 9523-9539. DOI 10.1007/s00253-015-6741-8.

MCVICAR, A. H. et WHITE, P. G., 1979. Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea solea* (L.). In : *Journal of Fish Diseases*. 1979. Vol. 2, n° 6, pp. 557-562. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00418.x>.

MCVICAR, A. H. et WHITE, P. G., 1982. The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). In : *Aquaculture*. 1 janvier 1982. Vol. 26, n° 3, pp. 213-222. DOI 10.1016/0044-8486(82)90157-0.

MILITZ, T., SOUTHGATE, P., CARTON, A. et HUTSON, K., 2013. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. In : *Aquaculture*. 15 septembre 2013. Vol. 408-409, pp. 95-99. DOI 10.1016/j.aquaculture.2013.05.027.

MITCHELL, S. O. et RODGER, H. D., 2011. A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. In : *Journal of Fish Diseases*. 2011. Vol. 34, n° 6, pp. 411-432. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01251.x>.

MIYAKE, S., SOH, M., AZMAN, M. N., NGOH, S. Y., ORBÁN, L. et SEEDORF, H., 2020. Insights into the microbiome of farmed Asian sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with symptoms of tenacibaculosis and description of *Tenacibaculum singaporense* sp. nov. In : *Antonie Van Leeuwenhoek*. juin 2020. Vol. 113, n° 6, pp. 737-752. DOI 10.1007/s10482-020-01391-9.

MURAS, A., MAYER, C., ROMERO, M., CAMINO, T., FERRER, M. D., MIRA, A. et OTERO, A., 2018. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by extracts of *Tenacibaculum* sp. 20J, a bacterium with wide-spectrum quorum quenching activity. In : *Journal of Oral Microbiology*. 1 janvier 2018. Vol. 10, n° 1, pp. 1429788. DOI 10.1080/20002297.2018.1429788.

NIKOSKELAINEN, S., BYLUND, G. et LILIUS, E.-M., 2004. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. In : *Developmental and Comparative Immunology*. 17 mai 2004. Vol. 28, n° 6, pp. 581-592. DOI 10.1016/j.dci.2003.10.003.

NOGA, E., 2000. Review Article: Skin Ulcers in Fish: Pfiesteria and Other Etiologies. In : *Toxicologic Pathology*. 2000. Vol. 28, n° 6, pp. 807-823. DOI 10.1177/019262330002800607.

NOWLAN, J., LUMSDEN, J. et RUSSELL, S., 2020. Advancements in Characterizing *Tenacibaculum* Infections in Canada. In : *Pathogens*. décembre 2020. Vol. 9, n° 12, pp. 1029. DOI 10.3390/pathogens9121029.

NOWLAN, J.P., 2020. QUANTITATIVE PCR DETECTION OF *TENACIBACULUM MARITIMUM* AND *TENACIBACULUM DICENTRARCHI* AT NETPEN SITES IN BRITISH COLUMBIA (CANADA). In : . 2020. pp. 186.

NYA, E. J. et AUSTIN, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). In : *Journal of Fish Diseases*. 2009. Vol. 32, n° 11, pp. 971-977. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01101.x.

OFFRET, C., DESRIAC, F., LE CHEVALIER, P., MOUNIER, J., JÉGOU, C. et FLEURY, Y., 2016. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. In : *Marine Drugs*. 8 juillet 2016. Vol. 14, n° 7, pp. E129. DOI 10.3390/md14070129.

- OLSEN, A. B., GULLA, S., STEINUM, T., COLQUHOUN, D. J., NILSEN, H. K. et DUCHAUD, E., 2017. Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. In : *Veterinary Microbiology*. 1 juin 2017. Vol. 205, pp. 39-45. DOI 10.1016/j.vetmic.2017.04.028.
- OLSEN, A. B., SPILSBERG, B., NILSEN, H. K., LAGESEN, K., GULLA, Snorre, AVENDAÑO-HERRERA, R., IRGANG, R., DUCHAUD, E. et COLQUHOUN, D. J., 2020. *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70, n° 12, pp. 6079-6090. DOI 10.1099/ijsem.0.004501.
- OSHIMA, S., HATA, J., SEGAWA, C. et YAMASHITA, S., 1996. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. In : *The Journal of General Virology*. octobre 1996. Vol. 77 (Pt 10), pp. 2441-2445. DOI 10.1099/0022-1317-77-10-2441.
- OSTLAND, V E, MORRISON, D et FERGUSON, H W, 1999. *Flexibacter Maritimus* Associated with a Bacterial Stomatitis in Atlantic Salmon Smolts Reared in Net-Pens in British Columbia. In : . 1999. pp. 11.
- PARK, S-C. et WON, S., 2018. Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. In : *Genomics & Informatics*. 31 décembre 2018. Vol. 16, pp. e24. DOI 10.5808/GI.2018.16.4.e24.
- PARTULA, S., GUERRA, A., FELLAH, J. S. et CHARLEMAGNE, J., 1995. Structure and diversity of the T cell antigen receptor beta-chain in a teleost fish. In : *The Journal of Immunology*. 15 juillet 1995. Vol. 155, n° 2, pp. 699-706.
- PARTULA, S., GUERRA, A., FELLAH, J. S. et CHARLEMAGNE, J., 1996. Structure and diversity of the TCR alpha-chain in a teleost fish. In : *The Journal of Immunology*. 1 juillet 1996. Vol. 157, n° 1, pp. 207-212.
- PAZOS, F., SANTOS, Y., MACÍAS, A. R., NÚÑEZ, S. et TORANZO, A. E., 1996. Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. In : *Journal of Fish Diseases*. 1996. Vol. 19, n° 2, pp. 193-197. DOI 10.1111/j.1365-2761.1996.tb00701.x.
- PEPIN, J-F. et EMERY, E., 1993. Marine cytophaga-like bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from French mediterranean coast. In : *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1 janvier 1993. Vol. 13, n° 5, pp. 165-167.
- PÉREZ-PASCUAL, D., LUNAZZI, A., MAGDELENAT, G., ROUY, Z., ROULET, Alain, LOPEZ-ROQUES, C., LAROCQUE, R., BARBEYRON, T., GOBET, A., MICHEL, G., BERNARDET, J-F. et DUCHAUD, E., 2017. The Complete Genome Sequence of the Fish Pathogen *Tenacibaculum maritimum* Provides Insights into Virulence Mechanisms. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 2017. Vol. 8. DOI 10.3389/fmicb.2017.01542. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01542/full>.
- PIÑEIRO-VIDAL, M., 2008. Descripción de tres nuevas especies del Género *Tenacibaculum* causantes de tenacibaculosis: aspectos taxonómicos y patogenicidad. In : . c 2008. pp. 239.
- PIÑEIRO-VIDAL, M., CENTENO-SESTELO, G., RIAZA CARCAMO, A. et SANTOS, Y., 2007. Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum*-related organisms from diseased turbot and sole cultured in Northwest of Spain. In : *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 1 janvier 2007. Vol. 27.
- PIÑEIRO-VIDAL, M., PAZOS, F. et SANTOS, Y., 2008. Fatty acid analysis as a chemotaxonomic tool for taxonomic and epidemiological characterization of four fish pathogenic *Tenacibaculum* species. In : *Letters in Applied Microbiology*. b 2008. Vol. 46, n° 5, pp. 548-554. DOI 10.1111/j.1472-765X.2008.02348.x.
- PIÑEIRO-VIDAL, M., RIAZA, A. et SANTOS, Y., 2008. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. a 2008. Vol. 58, n° Pt 1, pp. 21-25. DOI 10.1099/ijms.0.65397-0.
- POWELL, Mark, CARSON, J. et VAN GELDEREN, R., 2004. Experimental induction of gill disease in

Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. In : *Diseases of aquatic organisms*. 1 décembre 2004. Vol. 61, pp. 179-85. DOI 10.3354/dao061179.

REMOISSENET, G., TAMATA, T., JOUFOQUES, V., TEISSIER, A., TCHEPIDJIAN, Benoît, FROGIER, T., FLOHR, S., FLORES, D., DAGOURET, J-M., LE MARECHAL, B., DARRASSE, S., TEHAHE, R., COCHENNEC-LAUREAU, N., LEVY, P., BELLIARD, C. et NÉDÉLEC, G., 2006. Rapport final de la Convention N° 4.0021 du 23 avril 2004 : "Maîtrise technique de la production de poissons lagunaires ". In : . 2006. pp. 61.

REVERTER, M., SAULNIER, D., DAVID, R., BARDON-ALBARET, A., BELLIARD, Corinne, TAPISSIER-BONTEMPS, N., LECCHINI, D. et SASAL, P., 2016. Effects of local Polynesian plants and algae on growth and expression of two immune-related genes in orbicular batfish (*Platax orbicularis*). In : *Fish & Shellfish Immunology*. 1 novembre 2016. Vol. 58, pp. 82-88. DOI 10.1016/j.fsi.2016.09.011.

ROCHAT, T., FUJIWARA-NAGATA, E., CALVEZ, S., DALSGAARD, I., MADSEN, Lone, CALTEAU, A., LUNAZZI, A., NICOLAS, P., WIKLUND, T., BERNARDET, J-F. et DUCHAUD, E., 2017. Genomic Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* Serotypes and Development of a Multiplex PCR-Based Serotyping Scheme. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 12 septembre 2017. Vol. 8. DOI 10.3389/fmicb.2017.01752. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601056/>.

ROMALDE, J. L., RAVELO, C., LÓPEZ-ROMALDE, S., AVENDAÑO-HERRERA, R., MAGARIÑOS, B. et TORANZO, A. E., 2005. Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. In : *Developments in Biologicals*. 2005. Vol. 121, pp. 85-95.

ROMERO, M., MURAS, A., MAYER, C., BUJÁN, N., MAGARIÑOS, B. et OTERO, A., 2014. In vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 3 avril 2014. Vol. 108, n° 3, pp. 217-225. DOI 10.3354/dao02697.

SAHU, S., DAS, B. K., MISHRA, B. K., PRADHAN, J., SAMAL, S. K. et SARANGI, N., 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. In : *Aquaculture Research*. 2008. Vol. 39, n° 16, pp. 1720-1730. DOI 10.1111/j.1365-2109.2008.02048.x.

SALATI, F., CUBADDA, C., VIALE, I. et KUSUDA, R., 2005. Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. In : *Fisheries Science*. 1 mai 2005. Vol. 71, n° 3, pp. 563-567. DOI 10.1111/j.1444-2906.2005.01000.x.

SANTOS RODRIGUEZ, Y. et PAZOS ALVAREZ, F., 2000. Anti-*Flexibacter Maritimus* Vaccine (fm-95) for the Prevention of the Flexibacteriosis Marina Disease in Turbot and Salmonidae Fish, and Process for Producing Said Vaccine [en ligne]. 3 février 2000. Disponible à l'adresse : <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2000005341&tab=PCTDOCUMENTS>.

SANTOS, Y., PAZOS, F., BARJA, J. L., et INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA, 1999. *Flexibacter maritimus, causal agent of flexibacteriosis in marine fish*. Copenhagen K, Denmark : Council (ICES) = Le conseil (CIEM).

SAUGET, M., 2017. Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales. In : . 2017. pp. 141.

SAULNIER, D., BARDON-ALBARET, A., BASSET, C., BELIAEFF, B., ESTALL, H., FIEVET, J. et FLOHR, S., 2016. N° 0018 du 05/01/15 : *Rapport Final du marché négocié « AQUACULTURE-SANTE 2014-2015 »*, entre la Direction des Ressources Marines et Minières et Le Centre Ifremer du Pacifique (CIP) de 2014 à 2015. S.l.

SAULNIER, D., LIAO, V., DAVID, R., FIEVET, J., LEVY, P. et BELLIARD, C., 2013. *Essai préliminaire d'infection expérimentale de *Platax orbicularis* avec deux bactéries associées aux épisodes de mortalité en cage*

de grossissement Tenacibaculum maritimum et Vibrio harveyi. S.I.

SCHIKORSKI, D., RENAULT, T., PAILLARD, C., BIDAULT-TOFFIN, A., TOURBIEZ, D. et SAULNIER, D., 2013. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. In : *Aquaculture*. mai 2013. Vol. 392-395, pp. 106-112. DOI 10.1016/j.aquaculture.2013.02.005.

SHEU, S-Y., LIN, K-Y., CHOU, J-H., CHANG, P-S., AB, A., CHIU-CHUNG, Y. et CHEN, W-M., 2007. *Tenacibaculum litopenaei* sp nov., isolated from a shrimp mariculture pond. In : *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 1 juin 2007. Vol. 57, pp. 1148-53. DOI 10.1099/ij.s.0.64920-0.

SMÅGE, S. B., BREVIK, Ø. J., DUESUND, H., OTTEM, K. F., WATANABE, K. et NYLUND, A., 2016. *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov., a fish pathogenic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from Atlantic salmon. In : *Antonie van Leeuwenhoek*. 1 février 2016. Vol. 109, n° 2, pp. 273-285. DOI 10.1007/s10482-015-0630-0.

SMÅGE, S. B., FRISCH, K., VOLD, V., DUESUND, H., BREVIK, Øyvind J., OLSEN, R. H., SJAATIL, S. T., KLEVAN, A., BRUDESETH, B., WATANABE, K. et NYLUND, A., 2018. Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. In : *Aquaculture*. 1 octobre 2018. Vol. 495, pp. 858-864. DOI 10.1016/j.aquaculture.2018.06.063.

SOLTANI, M., SHAFIEI, Sh, YOSEFI, P., MOSAVI, Sh et MOKHTARI, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In : *Fish & Shellfish Immunology*. mars 2014. Vol. 37, n° 1, pp. 60-65. DOI 10.1016/j.fsi.2013.12.027.

SOLTANI, M., SHANKER, S. et MUNDAY, B. L., 1995. Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. In : *Journal of Fish Diseases*. 1995. Vol. 18, n° 6, pp. 555-565. DOI 10.1111/j.1365-2761.1995.tb00360.x.

SUZUKI, M., NAKAGAWA, Y., HARAYAMA, S. et YAMAMOTO, S., 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. septembre 2001. Vol. 51, n° Pt 5, pp. 1639-1652. DOI 10.1099/00207713-51-5-1639.

SWARUP-GAUCHER, S., 2011. *Molecular detection of pathogenic bacteria for Litopenaeus stylirostris and Platax orbicularis in French Polynesia: preliminary evaluation of zoosanitary status*. S.I.

TALPUR, A. D. et IKHWANUDDIN, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). In : *Aquaculture*. 5 octobre 2012. Vol. 364-365, pp. 6-12. DOI 10.1016/j.aquaculture.2012.07.035.

TERAMOTO, M., ZHAI, Z., KOMATSU, A., SHIBAYAMA, K. et SUZUKI, M., 2016. Genome Sequence of the Psychrophilic Bacterium *Tenacibaculum ovolyticum* Strain da5A-8 Isolated from Deep Seawater. In : *Genome Announcements* [en ligne]. 30 juin 2016. Vol. 4, n° 3. DOI 10.1128/genomeA.00644-16. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929521/>.

THOMPSON, C. C., VICENTE, A. C. P., SOUZA, R. C., VASCONCELOS, A. T., VESTH, T., ALVES, N., USSERY, D. W., IIDA, T. et THOMPSON, F. L., 2009. Genomic taxonomy of vibrios. In : *BMC Evolutionary Biology*. 27 octobre 2009. Vol. 9, n° 1, pp. 258. DOI 10.1186/1471-2148-9-258.

TORANZO, E., MAGARIÑOS, B. et ROMALDE, J., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. In : *Aquaculture*. 18 mai 2005. Vol. 246, n° 1, pp. 37-61. DOI 10.1016/j.aquaculture.2005.01.002.

TOYAMA, T., TSUKAMOTO, K. K. et WAKABAYASHI, H., 1996. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. In : *Fish*

- Pathology (Japan)* 1996. Disponible à l'adresse : <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP1997005466>.
- VAN CAM, A., 2009. *La pisciculture en Polynésie française : étude bibliographique et expérimentale des maladies et de leur gestion sanitaire*. 2009. S.l. : s.n.
- VAN GELDEREN, R., 2007. Vaccination of Atlantic salmon (~almo salar) against marine flexibacteriosis. In : . 2007. pp. 198.
- VAN GELDEREN, R., CARSON, J, GUDKOV, N et NOWAK, B.F., 2010. Physical characterisation of *Tenacibaculum maritimum* for vaccine development. In : *Journal of applied microbiology*. 1 juin 2010. Vol. 109, pp. 1668-76. DOI 10.1111/j.1365-2672.2010.04795.x.
- VAN GELDEREN, R., CARSON, J. et NOWAK, B., 2009. Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. In : *Journal of Fish Diseases*. août 2009. Vol. 32, n° 8, pp. 727-731. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01032.x.
- VAN GELDEREN, R., CARSON, J. et NOWAK, B., 2009. Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. In : *Aquaculture*. 2 mars 2009. Vol. 288, n° 1, pp. 7-13. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.11.012.
- WADE, J., 2020. Caractérisation de la bactérie *Tenacibaculum maritimum* et de la pourriture de la bouche pour informer les évaluations des risques de transfert d'agents pathogènes en Colombie-Britannique. In : . 2020. pp. 41.
- WAKABAYASHI, H et HIKIDA, M, 1984. Flexibacter infection in cultured marine fish in Japan. In : . 1984. pp. 7.
- WAKABAYASHI, H., HIKIDA, M. et MASUMURA, K.YR, 1986. Flexibacter maritimus sp. nov., a Pathogen of Marine Fishes. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1986. Vol. 36, n° 3, pp. 396-398. DOI 10.1099/00207713-36-3-396.
- WANGKAGHART, E., DEVILLE, S., WANG, B., SRISAPOOME, P., WANG, T. et SECOMBES, C. J., 2021. Immune response and protective efficacy of two new adjuvants, Montanide™ ISA 763B VG and Montanide™ GEL02, administered with a *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In : *Fish & Shellfish Immunology*. septembre 2021. Vol. 116, pp. 19-29. DOI 10.1016/j.fsi.2021.06.014.
- WAQALEVU, V., BESSON, M., GACHE, C., ROUX, N., FOGG, Lily, BERTUCCI, F., METIAN, M., LAFILLE, M-A., MAAMAATUAI AHUTAPU, M., GASSET, E., SAULNIER, D., LAUDET, V. et LECCHINI, D., 2020. Interplay between hormonal and morphological changes throughout a critical period of larval rearing in the orbicular batfish. In : *Aquaculture Reports*. 1 novembre 2020. Vol. 18, pp. 100521. DOI 10.1016/j.aqrep.2020.100521.
- WARSEN, A.E., KRUG, M. J., LAFRENTZ, S., STANEK, D. R., LOGE, F. J. et CALL, D. R., 2004. Simultaneous Discrimination between 15 Fish Pathogens by Using 16S Ribosomal DNA PCR and DNA Microarrays. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 juillet 2004. Vol. 70, n° 7, pp. 4216-4221. DOI 10.1128/AEM.70.7.4216-4221.2004.
- WILSON, T. et CARSON, J., 2003. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT PCR enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 mars 2003. Vol. 54, n° 2, pp. 127-134. DOI 10.3354/dao054127.
- WILSON, T, CARSON, J et BOWMAN, J, 2002. Optimisation of one-tube PCR-ELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. In : *Journal of Microbiological Methods*. 1 octobre 2002. Vol. 51, n° 2, pp. 163-170. DOI 10.1016/S0167-7012(02)00055-6.
- WOESE, C. R., YANG, D., MANDELCO, L. et STETTER, K. O., 1990. The Flexibacter-Flavobacter Connection. In : *Systematic and Applied Microbiology*. 1 mai 1990. Vol. 13, n° 2, pp. 161-165. DOI 10.1016/S0723-2020(11)80163-3.

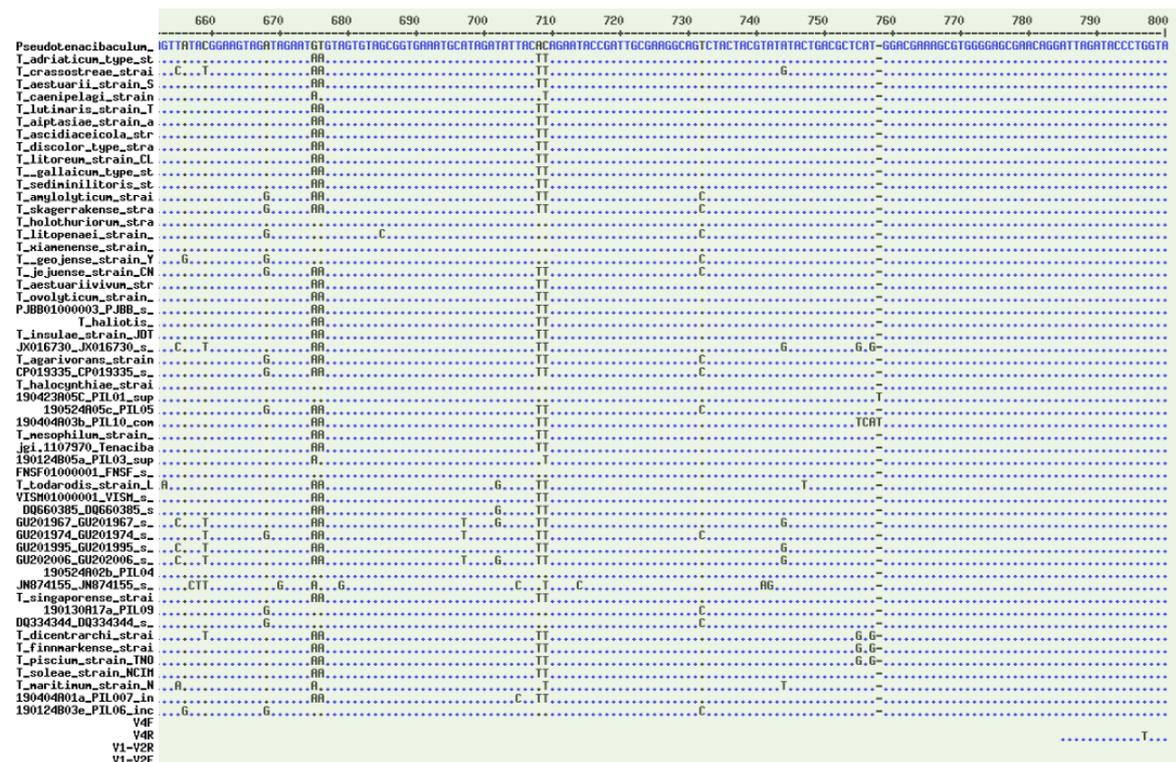
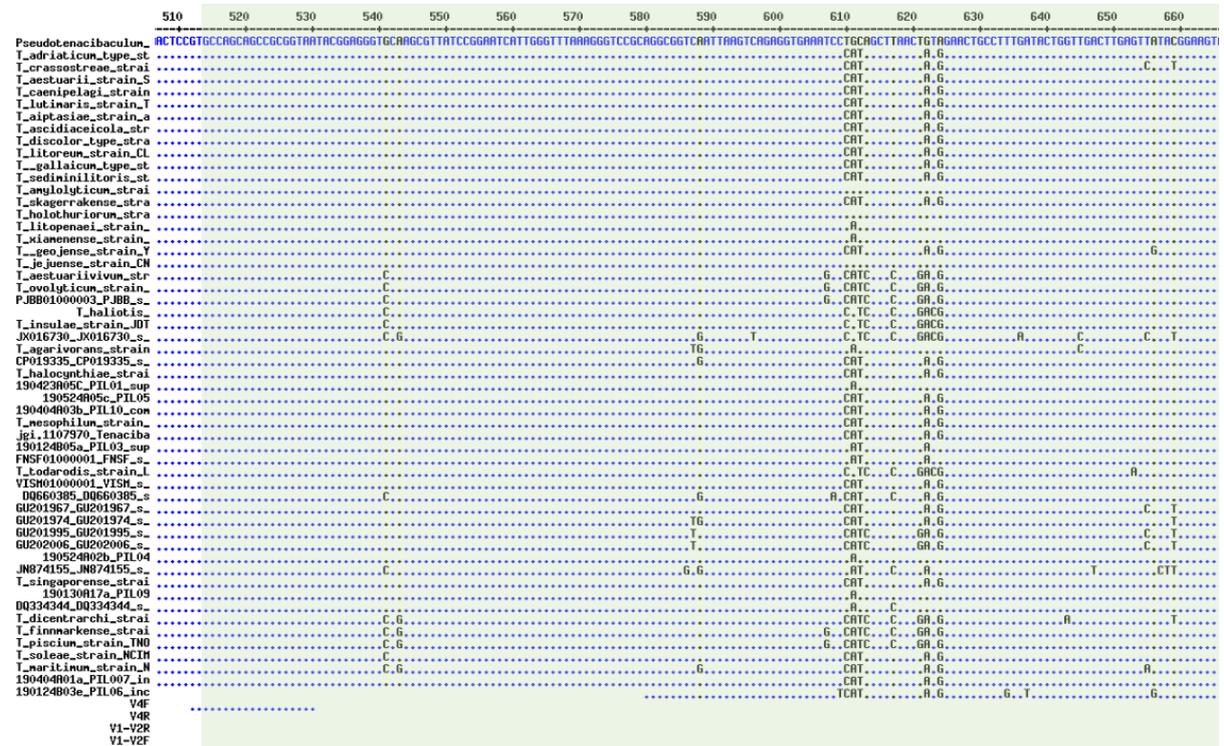
WYNNE, J. W., THAKUR, K. K., SLINGER, J., SAMSING, F., MILLIGAN, B., POWELL, J. F. F., MCKINNON, A., NEKOUEI, O., NEW, D., RICHMOND, Z., GARDNER, I. et SIAH, A., 2020. Microbiome Profiling Reveals a Microbial Dysbiosis During a Natural Outbreak of Tenacibaculosis (Yellow Mouth) in Atlantic Salmon. In : *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11, pp. 586387. DOI 10.3389/fmicb.2020.586387.

YARDIMCI, R. et TIMUR, G., 2016. Antigenic Characterisation of *Tenacibaculum maritimum* Isolates from Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) Farmed on the Aegean Sea Coasts of Turkey. In : *Journal of Aquaculture Research & Development*. 1 février 2016. Vol. 7, pp. 4. DOI 10.4172/2155-9546.1000408.

ANNEXES

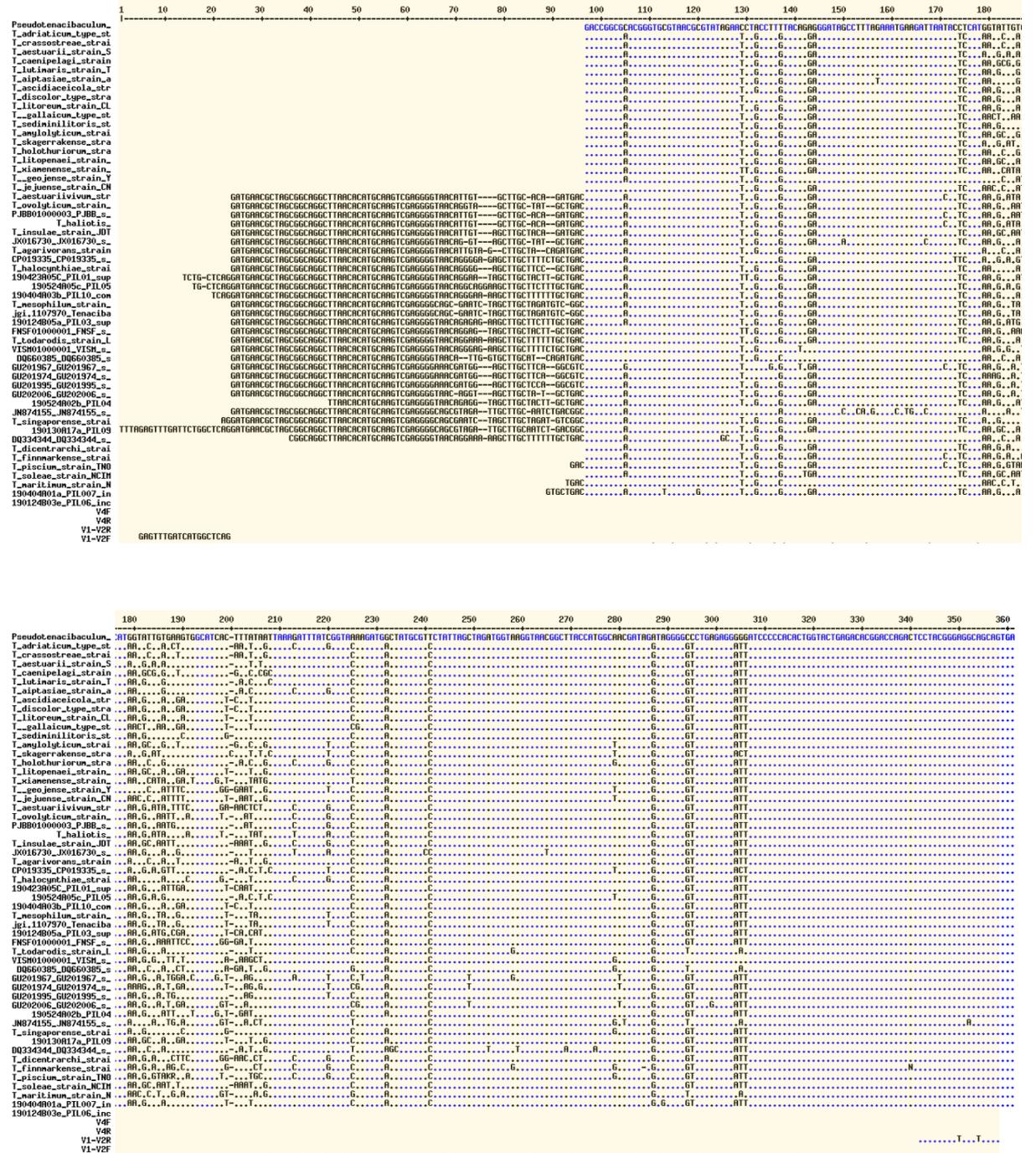
ANNEXE 1 : Alignement de la région V4 des séquences de référence et de souches polynésiennes, dont le génome complet a été séquencé (données non publiées), appartenant au genre *Tenacibaculum* à partir de la base de données EzBioCloud.

Les amorces délimitant le cadre de lecture représenté en vert sont 515F (nommée V4F sur la figure) et 806R (nommée V4R sur la figure).

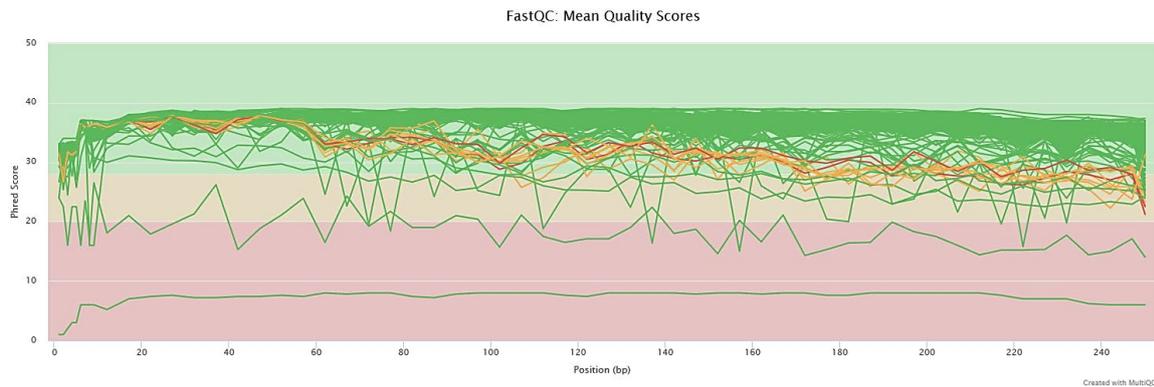


ANNEXE 2: Aligement de la région V1-V2 des séquences de référence et de souches polynésiennes, dont le génome complet a été séquencé (données non publiées), appartenant au genre *Tenacibaculum* à partir de la base de données EzBioCloud.

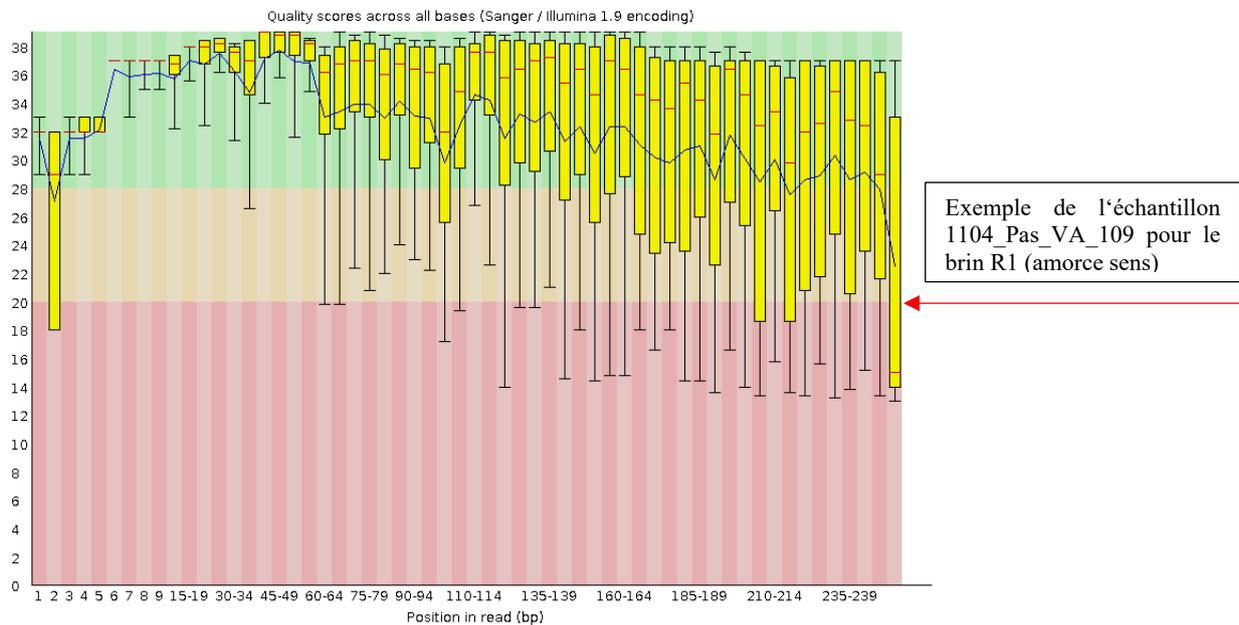
Les amorces délimitant le cadre de lecture représenté en jaune sont 27F (nommée V1-V2F sur la figure) et 357R (nommée V1-V2R sur la figure).



ANNEXE 3 : Présentation des fichiers MultiQc obtenus lors de l'étape de Pré-process avec les outils BBDuk et TrimGalore.



Présentation des scores qualité de l'ensemble des échantillons (MultiQc) obtenus suite au traitement des données avec l'outil BBDuk (paramètres par défaut)



Présentation du score qualité à partir de l'exemple d'un échantillon de mauvaise qualité (fastQc) représenté en rouge sur le graphique MultiQc présenté précédemment



Présentation des scores qualité de l'ensemble des échantillons (MultiQc) obtenus suite au traitement des données avec l'outil TrimGalore (paramètres par défaut).

ANNEXE 4 : La méthode de PCR quantitative permettant de détecter la présence d'inhibiteur de la réaction, développée par Pierre Lopez (données non publiées)

En parallèle de la mise au point d'une PCR quantitative pour *Tenacibaculum maritimum* (Seconde partie paragraphe III.1), Pierre Lopez a mis au point une méthode de PCR quantitative permettant de détecter la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification dans l'échantillon, afin qu'elles soient utilisées conjointement. Cette réaction consiste à ajouter le plasmide Puc57 en quantité connue (5fg) dans le mix réactionnel. Le plasmide contient la séquence du gène ciblé par la qPCR ciblant *Tenacibaculum maritimum*, mais la séquence servant à l'hybridation des sondes (Probe2) et amorces (qPCR2 F et qPCR2 R) ont été modifiée de manière à permettre l'hybridation des amorces et sondes (Test1 F, Test1 R et ProbeCI) sans modifier la composition en A, T, G et C. En l'absence d'inhibiteur dans l'échantillon testé, la qPCR doit indiquer la valeur de C_t correspondant à la quantité de plasmide incorporée, estimée entre 31 et 32,5. En cas de présence d'inhibiteur, la réaction n'indique pas de valeur de C_t (> 40 cycles). Le fluorochrome de la réaction à renseigner sur le thermocycleur pour la lecture des résultats est HEX.

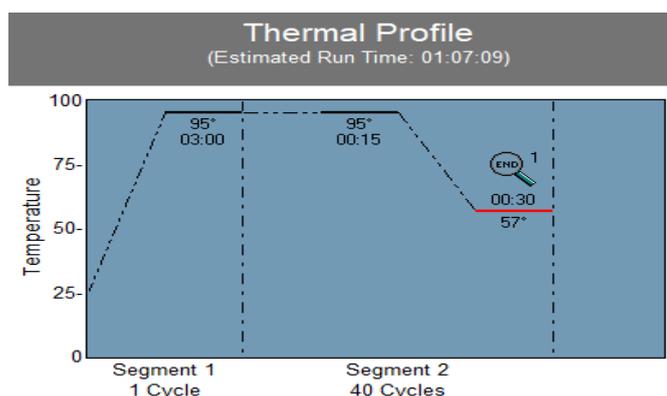
La réaction met en jeux les amorces et la sonde suivantes :

Nom	Fonction	Séquence 5'-3'
Test1 F	Amorce sens	ATGCTCTATCTTGATCTCATATCC
Test1 R	Amorce anti-sens	TGATCTAGCTATCCATCAACGTG
ProbeCI	Sonde	Hex 5'-CATATGTGTCAGTCTAGCAATTAGATATGC-3' BHQ1

Les réactifs sont présentés dans le tableau suivant :

Quantité	Réactifs	Concentration final
10 μ L	Brillant III Master Mix	
0.75 μ L	Amorce Test1F (8 μ M*)	300nM*
0.75 μ L	Amorce Test R (8 μ M*)	300nM*
0.5 μ L	Sonde control interne (8 μ M*)	200nM*
2.5 μ L	Plasmide Puc57 à 2fg/ μ L	
0.5 μ L	Eau de qualité biologie moléculaire	
5 μ L	Matrice (échantillon)	

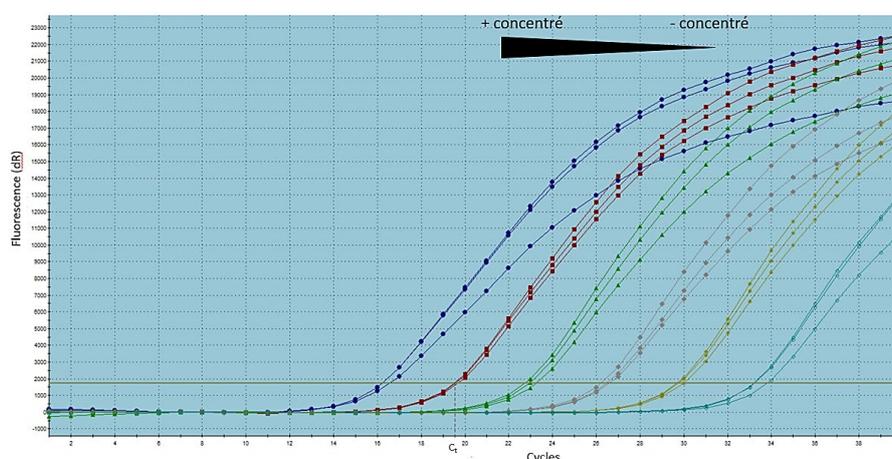
Le profil thermique de la réaction est le suivant :



ANNEXE 5 : Quelques informations sur la PCR quantitative

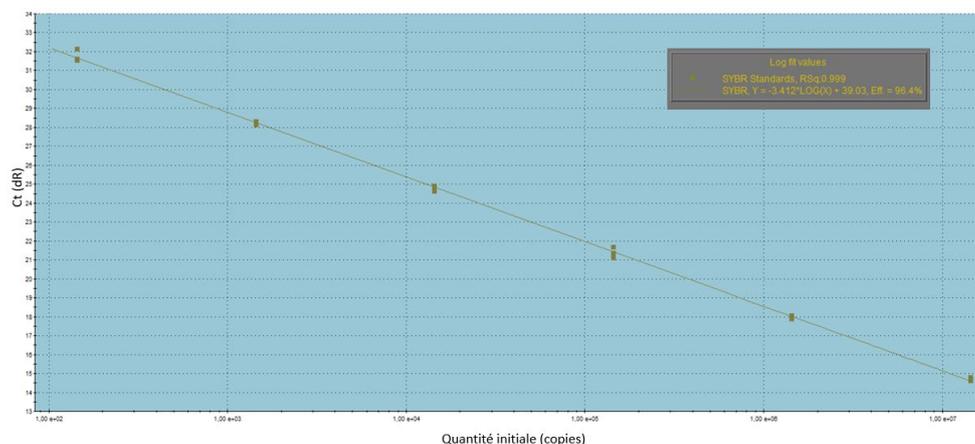
La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative, ou PCR en temps réel, permet d'obtenir la quantité initiale d'un fragment ADN cible dans un échantillon. Elle est basée sur la détection de la fluorescence d'une réaction à chaque cycle d'amplification. La quantité initiale de la séquence ADN amplifiée est déterminée à partir du nombre de cycles requis pour atteindre un niveau déterminé de produit.

La réaction PCR met en jeu deux séquences de quelques nucléotides, les amorces sens et anti-sens, qui s'hybrident spécifiquement en encadrant la séquence ADN cible à amplifier. L'analyse des résultats nécessite de fixer le seuil de référence de la réaction. Il peut être déterminé empiriquement, ou par un calcul statistique (méthode de la dérivée seconde), afin qu'il soit au dessus du « bruit de fond ». La valeur de C_t est le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour que la fluorescence atteigne le seuil de référence. Elle est fortement corrélée au nombre de copies de la séquence ADN cible de départ. Ainsi, plus l'échantillon est concentré en ADN cible, plus la valeur de C_t sera faible.



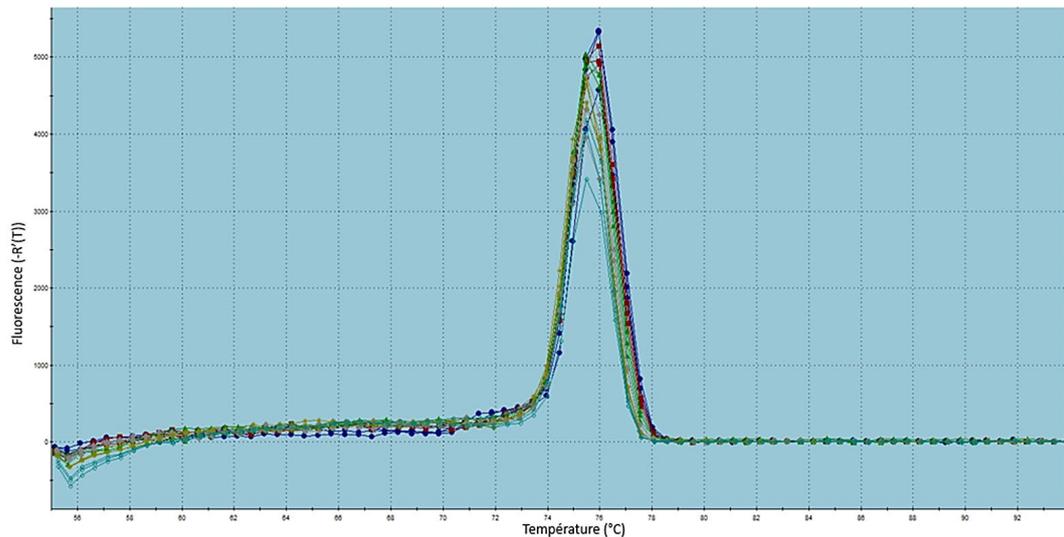
Tendances des courbes d'amplification et des valeurs de C_t en fonction de la concentration en ADN cible, avec l'exemple d'une gamme de concentrations de la souche TFA4 de *Tenacibaculum maritimum* pour la mesure de l'efficacité.

La mesure de l'efficacité de la réaction permet de déterminer les paramètres permettant de faire le lien entre la valeur de C_t de l'échantillon et la quantité d'ADN cible initial. Pour cela il faut déterminer la courbe standard à partir d'une gamme de plusieurs concentrations en ADN cible, avec un facteur de dilution de 10 entre chaque concentration. La pente de la droite obtenue est directement corrélée à l'efficacité.



Un exemple de courbe standard, permettant de déterminer l'efficacité de la réaction de PCR quantitative, à partir d'une gamme de concentrations de la souche TFA4 de *Tenacibaculum maritimum*.

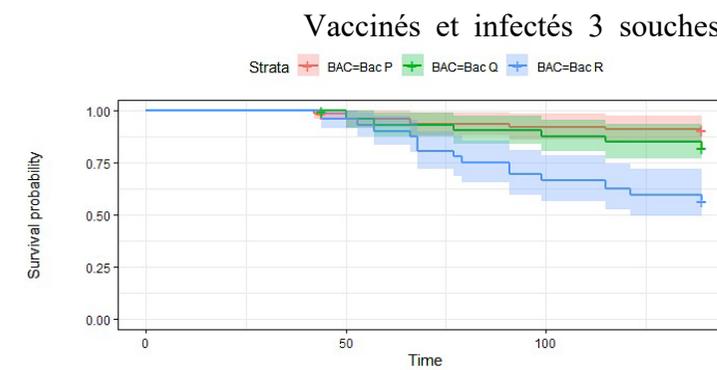
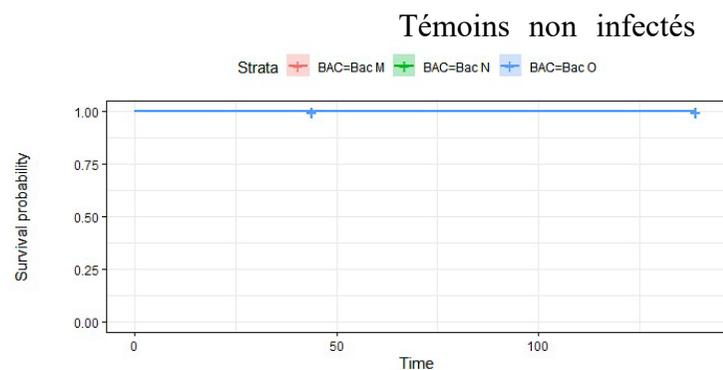
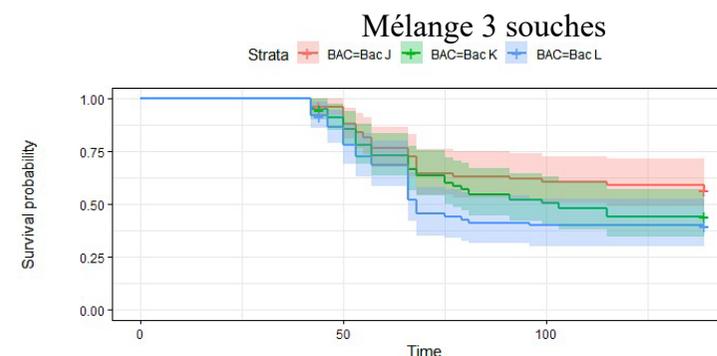
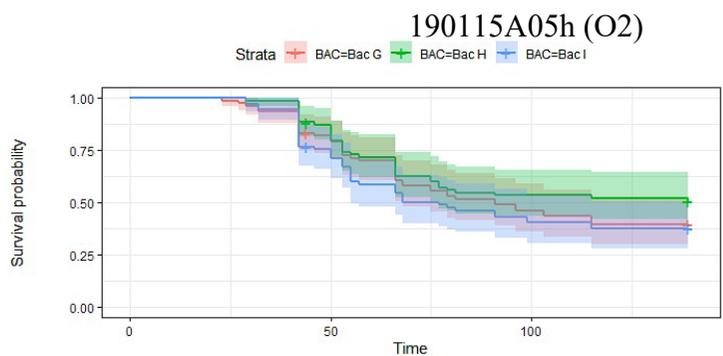
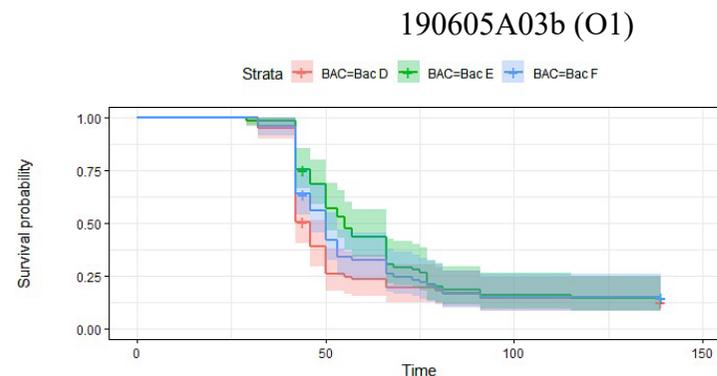
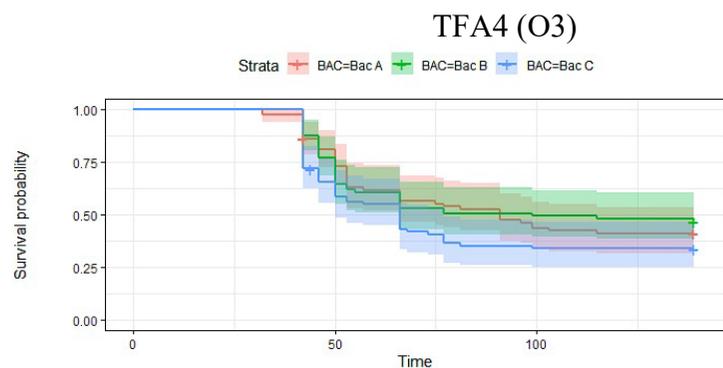
Deux chimies différentes peuvent être utilisées pour une PCR quantitative, la technologie SYBR Green et la technologie des sondes TaqMan. Avec une chimie SYBR Green, la fluorescence détectée correspond à la quantité d'ADN double-brin présent. Il est ainsi possible d'obtenir des produits non spécifiques (monomères ou dimères d'amorces) contribuant à la valeur de fluorescence. Une courbe de dissociation est alors réalisée à l'issue des cycles d'amplification et permet de vérifier la spécificité de la réaction. Il faut comparer la température de fusion des échantillons avec celle de l'ADN cible, si elle est similaire le produit d'amplification est identique.



Un exemple de courbes de dissociation à partir d'une gamme de concentrations de la souche TFA4 de *Tenacibaculum maritimum* pour la mesure de l'efficacité.

La technologie des sondes TaqMan met en jeu une sonde, soit une séquence de quelques nucléotides fortement spécifiques au fragment ADN cible. La fluorescence est révélée lorsque la sonde s'hybride sur l'ADN cible. La réaction est très spécifique et il n'y a alors pas de courbe de dissociation à analyser.

ANNEXE 6 : Les courbes de probabilité de survie de Kaplan-Meier de chaque bac pour le scenario 1, à savoir que les poissons « disparus » sont considérés comme morts.



ANNEXE 7 : Présentation des résultats de l'infection expérimentale 1 visant à évaluer la virulence des souches de *Tenacibaculum maritimum*, 190605A03b (O1), 190115A05h (O2) et TFA4 (O3), et la protection de l'étape de balnéation de l'essai vaccinal, selon le scenario 2 considérant les poissons « disparus » comme des retraits.

Afin de pouvoir comparer les courbes de probabilité de survie obtenues pour chaque condition (Figure 9.1 et 9.2 de l'annexe), il a tout d'abord été vérifié que les trois bacs d'une même condition présentaient des résultats homogènes.

Tableau 9.1 : Evaluation de l'homogénéité des résultats obtenus pour les trois bacs d'une même condition.

Bacs	ABC (O3)	DEF (O1)	GHI (O2)	JKL (3 souches)	MNO (Témoins)	PQR (Vaccinés)
p-value	0,1	0,1	0,2	0,09	/	0,001

Les résultats d'homogénéité des bacs sont similaires à ceux observés pour le scenario 1 (seconde partie paragraphe V.2.b), considérant les poissons « disparus » comme des morts. Les trois bacs de chacune des conditions évaluées présentent des résultats homogènes hormis, les bacs PQR qui correspondent aux poissons vaccinés par balnéation et infectés par un mélange des trois souches. Bien qu'un élément non identifié induise une différence significative des résultats du bac R par comparaison aux bacs P et Q, cet élément différenciant n'étant pas l'acte de la vaccination en lui-même, les trois bacs sont étudiés conjointement.

Les courbes de survie de Kaplan-Meier du scenario 2 sont présentées par les figures 9.1 et 9.2 (les courbes de chacun des bacs sont répertoriées en annexe 8). La figure 1 met en évidence les conditions d'infection par les souches 190605A03b (O1), 190115A05h (O2), TFA4 (O3), un mélange des 3 souches et les témoins non infectés, afin d'évaluer les différences de virulence. Quant à la figure 2, elle présente les résultats des probabilités de survie de l'essai vaccinal avec les conditions des témoins non infectés, de l'infection par le mélange 3 souches et des poissons vaccinés par balnéation puis infectés par le même mélange.

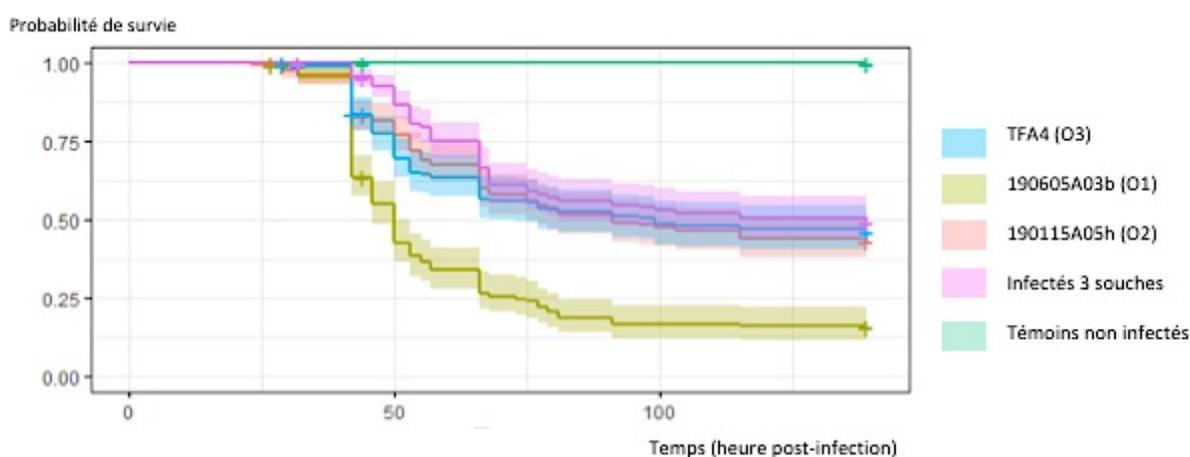


Figure 9.1: Courbes de survie de Kaplan-Meier des platex des conditions de l'infection expérimentale 1: Souche O1, O2, O3, mélange 3 souches et témoins non infectés (scenario 2).

Probabilité de survie

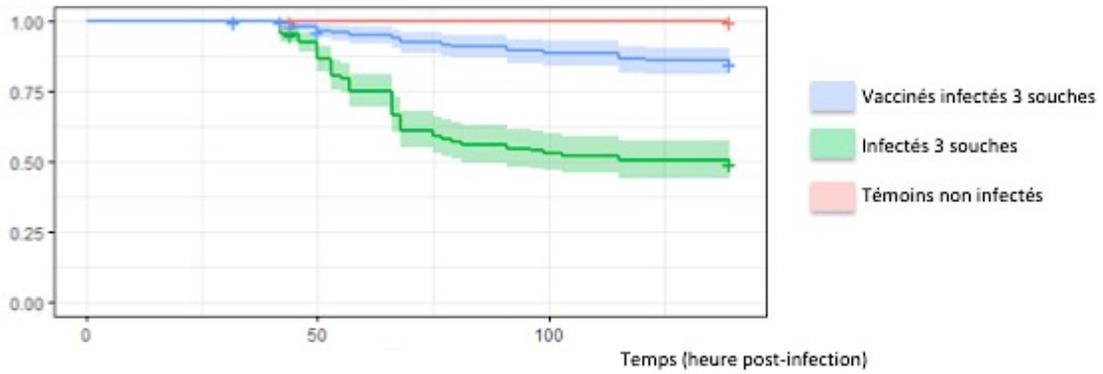


Figure 9.2: Courbes de survie de Kaplan-Meier des platex des conditions de l'infection expérimentale 1: témoins non infectés, infectés 3 souches et vaccinés et infectés 3 souches (scenario 2).

Un test du Log-Rank a été effectué afin d'observer s'il existe des différences significatives (p -value $< 0,05$) entre les 6 conditions étudiées (infection par la souche 190605A03b (O1), 190115A05h (O2), TFA4 (O3), un mélange des 3 souches, les témoins non infectés et les poissons vaccinés et infectés par un mélange des 3 souches).

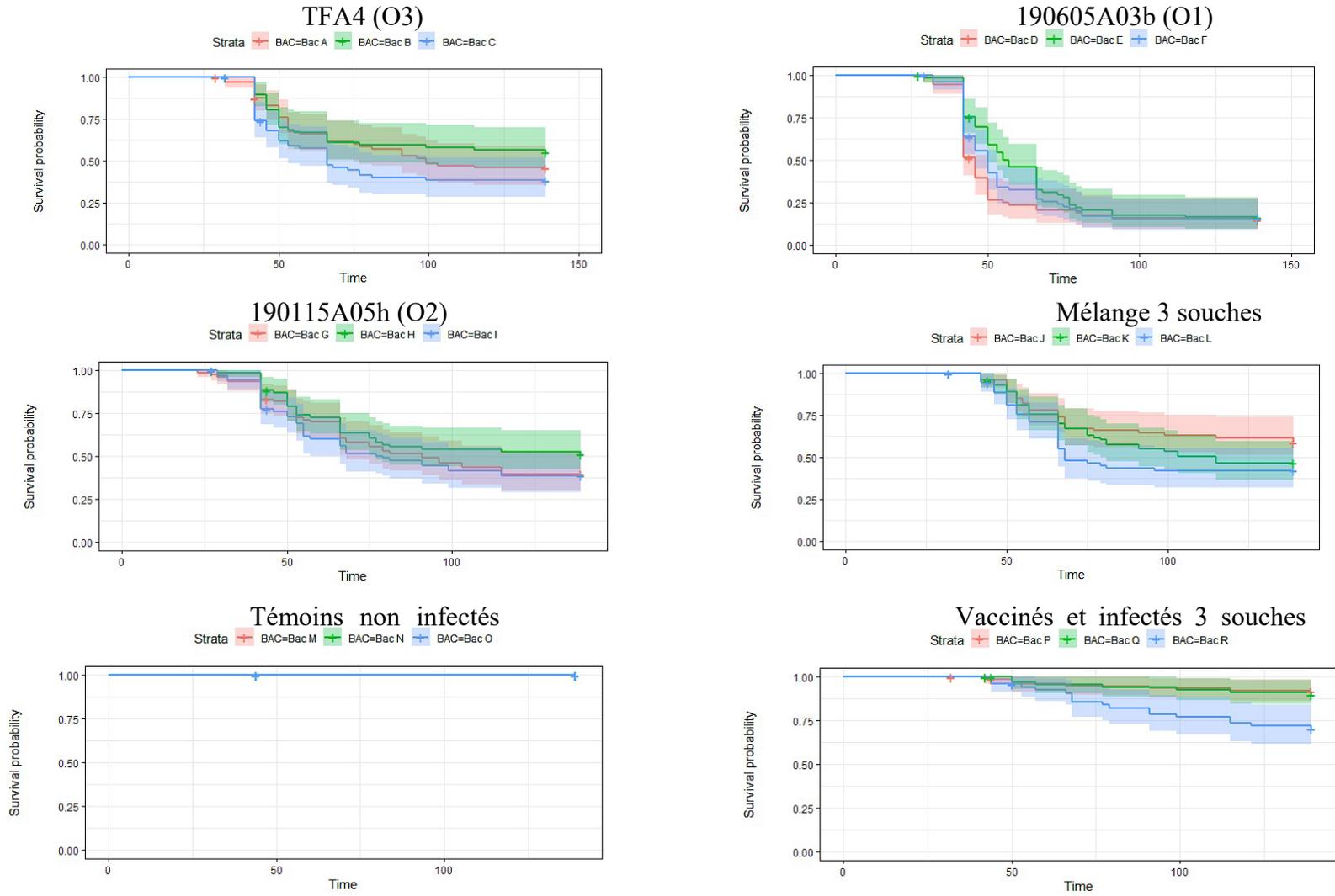
Tableau 9.2 : Test du log-rank indiquant les différences significatives ou non entre les courbes de survie de Kapla-Meier des 6 conditions évaluées (souche O1, O2, O3, mélange 3 souches, vaccinés et infectés 3 souches et non infectés).

Log-Rank test (P-value)	190115A05h (O2)	190605A03b (O1)	Non infectés	TFA4 (O3)	Infectés 3 souches
190605A03b (O1)	8.0e-14	-	-	-	-
Non infectés	$< 2e-16$	$< 2e-16$	-	-	-
TFA4 (O3)	0.73	1.4e-13	$< 2e-16$	-	-
Infectés 3 souches	0.11	$< 2e-16$	$< 2e-16$	0.18	-
Vaccinés et infectés 3 souches	$< 2e-16$	$< 2e-16$	3.3e-09	$< 2e-16$	3.7e-15

Les résultats sont de nouveau similaires à ceux du scenario 1, à l'exception de la condition des poissons infectés par les 3 souches qui n'est pas significativement différent de ceux infectés par la souche TFA4. Ainsi, les probabilités de survie pour une infection par les souches de sérotype O3, O2 et le mélange des trois sérotypes sont similaires tandis que celle de l'infection par le sérotype O1 est significativement plus faible. La condition des poissons ayant été vaccinés par balnéation est significativement différente de toutes les autres conditions, ce qui confirme que les taux de survie obtenus sont dûs à un effet protecteur induit par la vaccination.

Le rapport de hasard du modèle de Cox obtenu entre les conditions des poissons vaccinés puis infectés et des poissons infectés par le mélange trois souches indique une valeur de 4,4 [3 - 6,6] pour ce scenario 2. Cela signifie que les poissons vaccinés ont 4,4 fois moins de chance de mourir que les poissons non vaccinés et infectés par la même suspension bactérienne.

ANNEXE 8 : Les courbes de probabilité de survie de Kaplan-Meier de chaque bac pour le scenario 2, à savoir que les poissons « disparus » sont considérés comme des retraits.



NOM : BERGUES PRENOM : JOANNE

CARACTERISATION DES COMMUNAUTES ET POPULATIONS BACTERIENNES RESPONSABLES DE LA TENACIBACULOSE DU *PLATAX ORBICULARIS*, DANS LE CADRE DU DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE VACCINAL

RESUME : En Polynésie française, le développement d'une filière piscicole basée sur l'élevage du *Platax orbicularis* est considérablement affecté par la survenue d'épisodes infectieux de ténacibaculose, lors de la mise en cage lagunaires des poissons. Des avancées scientifiques récentes, comme le séquençage du génome de *Tenacibaculum maritimum*, ouvrent la voie vers le développement d'outils diagnostiques et épidémiologiques pour une meilleure compréhension de la maladie. Cette thèse présente une étude des communautés bactériennes détectées sur le tégument des platax en condition d'infection naturelle, ainsi que le développement d'un outil quantitatif ciblant les quatre sérotypes connus de *T. maritimum*. Un essai vaccinal y est également décrit.

MOTS CLEFS : TENACIBACULOSE, *PLATAX ORBICULARIS*, POLYNESIE FRANÇAISE, METABARCODING, SEROTYPES, VACCIN.

CARACTERISATION OF BACTERIAL COMMUNITIES AND POPULATIONS, RESPONSIBLE FOR TENACIBACULOSIS OF *PLATAX ORBICULARIS*, WITH THE GOAL TO DEVELOP A VACCINE (OR IN THE WAY OF A VACCINE DEVELOPMENT)

ABSTRACT: In French Polynesia, the occurrence of infectious episodes of tenacibaculosis has important consequences in the development of a fish farming industry based on the breeding of *Platax orbicularis*. These outbreaks happen when fishes are transferred into the sea-cages of farms. Recent scientific advances, such as the sequencing of the *Tenacibaculum maritimum* genome, are paving the way towards the development of diagnostic and epidemiological tools for a better understanding of the pathology. This thesis presents a study of the bacterial communities detected on the integument of platax during natural infections of tenacibaculosis. Then the development of a quantitative PCR targeting the four known serotypes of *T. maritimum* and a vaccine trial are described.

KEY WORDS: TENACIBACULOSIS, *PLATAX ORBICULARIS*, FRENCH POLYNESIA, METABARCODING, SEROTYPES, VACCINE.